

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio genético de la plaga del olivo "bactrocera oleae"
(Rossi 1790) y su aplicación al control biológico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Esther Lantero Bringas

Directoras

**M. Carmen Callejas Hervás
Beatriz Matallanas Peñas**

Madrid 2019

Estudio genético de la plaga del olivo *Bactrocera oleae* (Rossi 1790) y su aplicación al control biológico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

Esther Lantero Bringas

Madrid, 2018



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Biológicas

VºBº de la Directora de la Tesis

VºBº de la Directora de la Tesis

Fdo. Esther Lantero Bringas

Fdo. M. Carmen Callejas Hervás

Fdo. Beatriz Matallanas Peñas



Carmen Callejas Hervás, Profesora Titular del Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UCM y Beatriz Matallanas Peñas, Doctora en Biología por la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “Estudio genético de la plaga del olivo *Bactrocera oleae* (Rossi 1790) y su aplicación al control biológico” de la que es autora Esther Lantero Bringas, ha sido realizada bajo su dirección en el departamento de Genética, Fisiología y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, septiembre de 2018

Fdo.

Fdo.

FINANCIACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el marco de los siguientes proyectos:

1. Análisis de la estructura genética de poblaciones insectos plaga mediante marcadores moleculares y efectos de la composición y configuración del paisaje. Aplicación a *Bactrocera oleae*. AGL2010-15821. MICINN.
2. Control biológico de conservación de la mosca del olivo, *Bactrocera oleae*: Efecto de la estructura de paisaje e importancia de la depredación RTA 2013-00039-C03-03. Subdirección General de Investigación y Tecnología, INIA.
3. Marcadores Moleculares en el estudio poblacional de especies con interés agronómico y conservacionista. GR3/14 921385. Programa de Financiación de la Universidad Complutense de Madrid-Banco de Santander para Grupos de Investigación UCM validados.

Además, su autora ha disfrutado de dos ayudas para su estancia científica en el laboratorio de Entomología de la Escuela Superior Agraria del Instituto Politécnico de Bragança, IPB (Portugal) durante los meses de Mayo – Julio de 2017.

1. Erasmus + (P BRAGANC01).
2. Bolsa de viaje de la Sociedad Española de Genética.

Agradecimientos

Agradecimientos

A Carmen y Bea (me ahorro el formalismo de “a las Dras Callejas y Matallanas”), mis directoras de tesis durante estos últimos cuatro años, madre y hermana científicas desde hace siete. Gracias por enseñarme todo lo que sé. Por esos empujones constantes que me han permitido superar muchos miedos y limitaciones, por los ánimos, por la confianza que habéis depositado en mí y en nuestro trabajo. Por todas las correcciones (de verdad), los correctivos y la paciencia de todos estos años y en especial de los últimos meses. Estoy enormemente agradecida por todo lo que me habéis dado más allá de la formación académica, las terapias, las consultas, la crónica social, la cinta de arpillera granate, las tres cervezas y mi jarra de agua, el grupo de whatsapp y los consejos, entre muchas otras cosas.

A María Dolores Ochando, Lola, por permitirme participar en su grupo de investigación y en su proyecto cuando solo era una estudiante de licenciatura, por su ayuda y confianza ofrecida en todo momento. A Susana Pascual, por abrirme las puertas del Patrol del INIA y de los olivares del sur de Madrid. Por incluirme en el proyecto, los muestreos, los consejos y aclaraciones, por aportar la perspectiva entomológica y paisajística en un reino de bases nitrogenadas.

A mis evaluadores externos, por el esfuerzo y enorme favor que me han hecho emitiendo sus informes teniendo en cuenta las fechas tan malas (mediados de agosto) en las que se les envió la tesis.

A todos aquellos con los que he compartido esta aventura en la facultad y el departamento. A M^a Carmen y José, por su paciencia ante mi torpeza informática, por la elaboración de reactivos, solicitud de facturas y presupuestos, por las visitas al despacho durante la escritura y las palabras de ánimo. A todos los profesores y compañeros con los que he tenido el placer de compartir prácticas, comidas en la sala de reuniones, ratos de juegos y conversaciones, en especial a Alicia y Pilar, siempre pendientes de mis progresos y dispuestas a prestarme su ayuda. A Charo, por autorizarme las visitas de los colegios y tenerme en cuenta en las actividades organizadas por el departamento. A Espino, por tomarme el pelo constantemente y abrirme las puertas de la SEG a pesar de no saberme el prefijo de Portugal. A Rosa, por los trámites en secretaría facilitando el maravilloso papeleo.

A África, mi compañera de fatigas y despacho, porque el mal de muchos es el consuelo de los tontos y hemos sufrido todo este proceso prácticamente a la vez, estancias incluidas. Por cantarme algo todos los días y seguirme siempre la corriente. Por ese congreso de la SEG en Córdoba en 2015 donde empezó todo (y yo me quedé sin AVE). A Belén y José (Limón), por

soportar mis discursos y mi carácter. A Sergio, por los favores con los niños listos y despertar mi vena entomológica. Así mismo, a todos vosotros, gracias por los desayunos en forestales.

Especial agradecimiento a los que estaban ahí desde el principio de los tiempos. Iván, juntos desde los 3 años y a Nacho, desde segundo de carrera. Por confiar en mí todo lo que yo no confío, por apoyarme, animarme, muestrar conmigo un domingo, hacer fotos a mis bichos o venir a la facultad a tomar un café para hablar un rato. Por aportarme a ratos algo de sentido común (aunque parezca mentira) y rescatarme del mundo “tesis” cuando lo necesitaba. A Marta, por haber estado ahí siempre, aquí sólo podía quedar uno y esa has sido tú. Hemos sobrevivido a la carrera, al máster, a mi tesis y espero que a las muchas otras cosas que vengan en los próximos años. A Pablo, porque estés donde estés y aunque pasemos meses sin hablar sigues ahí. A Merc y Asier, por sacar siempre un momento para un café, una cena o un whatsapppeo.

Quiero dar las gracias a mis padres por el apoyo proporcionado y los ánimos para seguir adelante en estos cuatro años que ha durado esta aventura. Gracias porque se lo que supone aguantar mi mal humor, mi cansancio, mis quejas, mis enfados, mis agobios y todos mis momentos de frustración, que han sido muchos. Por hacérmelo más fácil y haber respetado mi decisión de llevar a cabo esta tesis doctoral sin dejar que en ningún momento tirase la toalla. Así mismo, gracias a mis hermanas (Belén y Ana) y hermano (Pablo), porque de un modo u otro han sufrido todo esto conmigo. Gracias a mis abuelos y tíos, porque, aunque no han visto mis ojeras a diario me han preguntado por mis avances sábado tras sábado y a día de hoy se saben de memoria esta tesis doctoral. Gracias a todos por la paciencia y confiar en que conseguiría alcanzar esta meta, este logro es en buena parte mérito vuestro.

A Javier, la persona que más lejos ha estado en este proceso pero que más cerca he sentido siempre, mi tesis ha tenido la emoción extra de haberla vivido contigo en Alemania haciendo la tuya. Por haber conseguido que estos cuatro años separados fuesen una aventura y no una carga, por hacer que quiera superarme día tras día, por las visitas relámpago de fin de semana, las llamadas, los skypes, la contraseña de tu cuenta de Netflix... Gracias por tener siempre esa fe que a mi tanto me faltaba y saber que podría con todo aun cuando lo veía todo muy negro.

Finalmente, a la resiliencia. Prometí incluir esta palabra en algún lugar de la tesis y va a ser aquí. Por las veces que las cosas se han torcido y he conseguido recuperarme, adaptarme y superarlo. Por todos los *noes* recibidos que me han empujado más lejos que muchos *síes*.

A todos vosotros, muchas gracias.

A mi familia, Javier y en especial a mi abuelo

“One of the beautiful things about science is that it allows us to bumble along, getting it wrong time after time, and feel perfectly fine as long as we learn something each time... The more comfortable we become with being stupid, the deeper we will wade into the unknown and the more likely we are to make big discoveries.” Schwartz MA 2008.

Índice

Resumen	3
Summary	9
Introducción general	15
Objetivos	25
CAPÍTULO 1	
Introducción	29
Material y métodos	34
Resultados	45
Discusión	74
CAPÍTULO 2	
Introducción	87
Material y métodos	92
Resultados	97
Discusión	107
CAPÍTULO 3	
Introducción	121
Material y métodos	126
Resultados	135
Discusión	147
Discusión general	155
Conclusiones	163
Conclusions	167
Bibliografía	171

Resumen

Resumen

Con más de 2.5 millones de hectáreas dedicadas al olivo, España es el principal productor y exportador mundial de aceite de oliva y aceituna de mesa. La mosca *Bactrocera oleae*, considerada la mayor plaga del cultivo en el Mediterráneo, genera graves pérdidas para el sector olivarero. El conocimiento biológico de esta especie es fundamental para una lucha eficaz. Por este motivo, esta tesis doctoral titulada “Estudio genético de la plaga del olivo *Bactrocera oleae* (Rossi 1790) y su aplicación al control biológico” profundizará en el análisis de la estructura genética de plaga, la caracterización de las resistencias a organofosforados en el área mediterránea y el diseño de herramientas moleculares para evaluar la contribución de la fauna edáfica olivarera al control biológico por depredación como medida más respetuosa con el agroecosistema.

Mediante marcadores mitocondriales e intermicrosatélites nucleares se han caracterizado los niveles de diversidad genética y sus patrones de distribución en las poblaciones españolas y otros cinco países productores de la cuenca del Mediterráneo. Los valores de diversidad genética fueron muy elevados y guardarían relación con el largo tiempo que *B. oleae* lleva establecida en el área analizada, cuya última expansión se ha estimado en unos 66,000 años, y con grandes tamaños poblacionales. Ambos marcadores reflejaron la ausencia de diferenciación entre las poblaciones ibéricas, que constituirían una gran metapoblación. Esta estructura se ve apoyada por un flujo genético considerable, facilitado por la vasta extensión dedicada a este cultivo, que conduciría a la homogenización de las mismas.

Al considerar todas las poblaciones analizadas, se han identificado 73 haplotipos mitocondriales cuya distribución tiene un marcado patrón geográfico que permitió diferenciar dos grandes grupos genéticos *Este*, que incluiría las poblaciones de Israel y Grecia 3 y *Oeste* con las poblaciones de Península Ibérica, Italia, Túnez, Grecia 1 y Grecia 2, que a su vez exhibe subestructura considerándose entidades genéticas diferentes. Esta estructura estaría principalmente modelada por el flujo genético entre las poblaciones y las rutas de colonización seguidas por la especie. Una población ancestral, del centro-este del continente africano ascendería por África y colonizaría el Mediterráneo de este a oeste y en paralelo, por el norte de África hacia las 3 penínsulas, haría unos 459,000 años. Durante las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, estas poblaciones permanecerían en los diferentes refugios glaciales desde donde se expandieron hace unos 61,500 años. Los marcadores ISSR no mostraron un patrón

geográfico de la diversidad, si bien una tendencia a separar las poblaciones del Este del mediterráneo.

El control clásico de esta plaga desde los años 50 se ha realizado mediante insecticidas organofosforados. Como consecuencia de su uso desmedido se ha incrementado la frecuencia de alelos que confieren resistencia a estos insecticidas en poblaciones naturales de mosca del olivo. En el segundo capítulo se ha analizado la presencia y distribución de las tres mutaciones descritas en los exones IV, VII y X del gen *ace*, que codifica la enzima acetilcolinesterasa, diana de los organofosforados, relacionadas con una mayor insensibilidad de la mosca del olivo a los mismos.

El estudio de una amplia muestra de las poblaciones del territorio olivarero español, hasta el momento pobremente caracterizado, reflejó que alrededor del 88% de las moscas presentaron un alelo resistente, bien en homocigosis o en heterocigosis. Los alelos con las mutaciones que confieren resistencia en los exones IV y VII, presentaron unas frecuencias altas, ambas próximas al 75%. Estas elevadas frecuencias reflejan la considerable presión de selección ejercida por estos insecticidas. El estudio filogeográfico del exón IV sitúa en regiones del Mediterráneo oriental el posible origen del alelo que confiere la resistencia.

Al analizar conjuntamente ambos exones se observó que el genotipo del 60% de las moscas españolas fue homocigoto para los alelos de resistencia en los dos exones, del 80% y 89.6% en Italia y Grecia respectivamente, lo que pone de manifiesto la ventaja proporcionada por la combinación de estos dos alelos frente al resto en un entorno olivarero tratado con pesticidas. Por el contrario, la mutación del exón X solo se identificó en 2 individuos de España, 11 en todo el Mediterráneo y en todos los casos en heterocigosis, evidenciando el impacto de esta delección sobre la eficacia biológica del individuo que la porta.

La amplia y elevada presencia de alelos de resistencia y los efectos no deseados de los productos químicos en el tratamiento de las plagas nos llevan a la búsqueda de alternativas solidarias con el ambiente y la fauna beneficiosa. En este contexto surgen las guías de Gestión Integrada de Plagas, que contemplan el control de las plagas, siempre que sea posible, con métodos biológicos, culturales, biotecnológicos o físicos antes que con cualquier método químico. La comunidad edáfica del olivar puede jugar un papel clave en el control de las poblaciones de mosca del olivo durante los meses de otoño e invierno, cuando la pupa (su estadio más vulnerable) permanece enterrada en el suelo, hasta que mejora las condiciones climáticas. La detección de las especies que depredan a *B. oleae* resulta, por tanto, esencial si se quiere fomentar su presencia para realizar un control biológico.

Por este motivo, el tercer objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un método de detección por PCR del DNA mitocondrial de mosca del olivo en el tracto digestivo de potenciales depredadores para estudios moleculares *post mortem* de la depredación. Nuestros resultados evidenciaron la especificidad de las 7 parejas de cebadores y su sensibilidad para detectar la presencia de DNA de *B. oleae* incluso transcurridas 48 horas post-ingesta. Así mismo, la aplicación de este método en el análisis *post-mortem* de artrópodos recogidos en olivares de Madrid confirmó, en primer lugar, la idoneidad de los cebadores diseñados y del método desarrollado en condiciones reales de depredación. Y, en segundo lugar, se pudo comprobar que los cuatro grupos taxonómicos muestreados Dermaptera, Araneae, Formicidae y Carabidae habían ingerido moscas del olivo, aunque los dos primeros mostraron una tasa mayor de depredación en esta primera aproximación al análisis de la contribución de la artropodofauna del olivar al control de la especie plaga.

Palabras clave: *Bactrocera oleae*, DNA mitocondrial, variabilidad genética, filogeografía, gen *ace*, insecticidas organofosforados, control biológico por depredación, marcadores moleculares.

Summary

Summary

Spain, with more than 2.5 million ha dedicated to the olive cultivation, is the main producer and exporter of olive oil and table olives worldwide. The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is considered the major pest in the Mediterranean groves and its presence causes several economic losses given the premature fall of the olive fruit or the devaluation of the olive oil quality. Thus, the present PhD thesis titled “Genetic study of the olive pest *Bactrocera oleae* (Rossi 1790) and its application to biological control” has three main objectives: to increase the knowledge of its genetic structure in the Mediterranean basin, the characterization of the mutations associated to organophosphates resistance in its populations and the design of a molecular tool to identify the contribution to the biological control of the potential predators present at the olive agroecosystem.

The levels of genetic diversity and their distribution patterns in the Spanish olive fruit fly populations and other five producer countries of the Mediterranean basin have been characterized using mitochondrial markers and nuclear intermicrosatellites. The values of genetic diversity resulted very high. This fact would be related to the long time elapsed since *B. oleae* is established in the analysed area, whose last expansion has been estimated by molecular dating in about 66,000 years. Also, this high variability would be related to the large population size. Both types of markers reflected the absence of differentiation among the Iberian populations and the fact that they would constitute a single large population. This structure is supported by a considerable gene flow, facilitated by the vast extension dedicated to this crops, which would lead to its genetic homogenization.

A total of 73 mitochondrial haplotypes have been identified in the 27 populations analysed, whose distribution revealed a clear geographical pattern that allowed to differentiate two large genetic groups: *East*, with the populations of Israel and Greece 3 and *West* with the populations of the Iberian Peninsula (PI), Italy, Tunisia, Greece 1 and Greece 2. This second group also exhibits genetic substructure, where samples from PI, Tunisia and Italy would constitute different genetic entities. This structure would be mainly supported by the gene flow between populations and the colonization routes followed by the species. An ancestral *B. oleae* population, from the centre-east of the African continent would ascend through Africa and colonize the Mediterranean about 459,000 years ago, from east to west and in parallel, through the north of Africa and towards the 3 peninsulas. During the climatic fluctuations of the Pleistocene, these populations would remain in the different glacial refuges from where they expanded 61,500 years ago. The ISSR markers did not show a geographical

pattern of diversity, although there was a tendency to split eastern populations from the rest of the Mediterranean samples.

The traditional control of *Bactrocera oleae* populations has been performed with organophosphate insecticides. Given the abuse of these products during last decades, the frequency of insecticide resistance has increased and resistant alleles have spread along the Mediterranean basin. The objective of this work was to analyse the presence and distribution of the three mutations described in the *ace* gene related to the insensitivity to organophosphates in the Mediterranean populations of the olive fruit fly.

The Iberian Peninsula, until now poorly characterized, revealed extremely high frequencies for the resistant alleles in exons IV and VII, both around the 75%. These high frequencies evidence the enormous selective pressure made by the insecticides during last decades. 60% of the specimens from Spain carried both resistant alleles in homozygosis, the 51% at the Mediterranean basin, showing the great advantage of these genotype instead other allele combinations in an olive agroecosystem treated with pesticides. On the contrary, the exon X mutation had an extremely low frequency, being present just in two flies from Spain, 11 in the whole area sampled, and always was found in heterozygosis, suggesting at the evident fitness cost on the individuals that carry this deletion.

The wide presence of resistant alleles and the undesired effects of chemical products in pest control compel us to find new environmentally friendly approaches to control *Bactrocera oleae* populations. In this context, the EU and the different European countries promoted an Integrated Pest Management (IPM) where the olive fruit fly should be treated with biological, cultural, biotechnological or physical methods limiting the use of insecticides to those moments of high density of pest populations.

The ecosystem service provided by ground dwelling arthropods in the olive groves during late autumn to early spring is essential to control the olive fruit fly. Late generations of this pest overwinter in the soil as pupae, being more susceptible to generalist predators. In this context, the identification of these potential predators is essential to promote their presence in the olive groves. Thus, the objective of this work was to develop molecular tool to detect by PCR the mitochondrial DNA of *B. oleae* in its potential predators' gut in *post mortem* analyses. Our results revealed that the 7 PCR primers designed to achieve this goal were highly specific and sensitive. Also, feeding trials allowed determining that we are still able to detect olive fruit fly DNA in their predators gut up to 48 hours post feeding under real digestive conditions. This reliable tool was tested in a field assay to determine the contribution of the different potential

predators to the control of this pest in the south east of Madrid, under real predation conditions. Our preliminary approach confirmed predation in Dermaptera, Araneae, Carabidae and Formicidae groups; being the contribution of spiders and earwigs higher than the rest. However, further analysis will be performed to determine the contribution of each group along the year.

Key words: *Bactrocera oleae*, mitochondrial DNA, genetic variability, phylogeography, *ace* gene, organophosphate insecticides, biological control mediated by predation, molecular markers.

Introducción general

El complejo de especies del olivo se engloba en el género *Olea*, siendo *Olea europaea* subsp. *europaea* la más emblemática de la cuenca mediterránea. Esta subespecie divergió de la asiática *cuspidata* hace unos 4.5 millones de años, colonizando el norte de África y las regiones del sur de Europa, en zonas áridas de clima mediterráneo (Besnard *et al.* 2009).

Las evidencias del uso del olivo silvestre o acebuche como fuente de alimentación y de madera o el empleo de sus aceites en perfumería y fuel para lámparas se tienen desde el Neolítico (Kaniewsky *et al.* 2012). Pero, no es hasta la Edad de Bronce cuando éste se domestica y el cultivo se hace extensivo. El origen del cultivo es controvertido. Algunos autores lo sitúan en el periodo comprendido entre el 4,000 a.C. (Loukas y Krimbas 1983) y el 3,500 a.C. (Zohary y Hopf 1994) en las regiones de Siria e Irán, desde donde se extendería al resto del Mediterráneo. Por el contrario, Breton *et al.* (2009), tras encontrar evidencias de explotación oleícola en el sur de la Península Ibérica en este mismo período, postulan la existencia de varios centros de domesticación en el Mediterráneo. Independientemente de su origen, la hipótesis más aceptada sobre la expansión del olivo plantea que aquellos acebuches que producían un fruto de mayor tamaño o con un contenido superior en aceites eran seleccionados y propagados de forma vegetativa (Lumaret *et al.* 2004). De esta manera, los clones se extenderían por toda la cuenca mediterránea gracias a las rutas comerciales, primero de los fenicios y posteriormente de griegos y romanos (Bartolini *et al.* 2002).

En las civilizaciones mediterráneas el olivo también era un árbol con numerosas connotaciones simbólicas. En Egipto su aceite se empleaba para embalsamar y elaborar perfumes. En Grecia era considerado un árbol sagrado entregado por Atenea a los habitantes de la región de Ática y el aceite llegó a emplearse como moneda (Vaquerizo - Gil 2011).



Figura 1. Relieve del frontón occidental del partenón de Atenas. La diosa Atenea regaló el olivo a los griegos tras su victoria en la lucha contra Poseidón por el dominio de las tierras. Imagen tomada de <http://pedro-mundodebabel.blogspot.com>.

Hoy en día, el cultivo del olivo, con una extensión mundial de más de 10 millones de hectáreas (datos del Consejo Oleícola Internacional, COI), sigue siendo el cultivo clave del Mediterráneo, área que alberga la mayor parte de la producción.

España concentra un 45% de la producción mundial en sus más de 2.5 millones de hectáreas, lo que le convierte en el principal país productor de aceite de oliva y aceituna de mesa. La Figura 2 plasma los datos de las cinco últimas campañas en los principales países productores del mediterráneo. Como puede apreciarse, la producción española cuadruplica al del segundo país productor de aceite de oliva, Italia, y al de aceituna de mesa, Grecia (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, MAPAMA).

El olivo y su producción constituyen, por tanto, un pilar esencial de nuestro sistema agroalimentario, con una elevada repercusión económica, social y ambiental (AAO, Agencia para el Aceite de Oliva). Con más de cien variedades diferentes, está presente en treinta y cuatro provincias españolas. Andalucía, con un 62% de superficie de cultivo dedicada al olivar, es la principal Comunidad productora, concentrando la mayor parte del cultivo en las provincias de Sevilla, Jaén y Córdoba. Con mucha diferencia le siguen Castilla La Mancha (14%), Extremadura (11%) y Cataluña (5%) (Gómez del Campo y Barranco 2009).

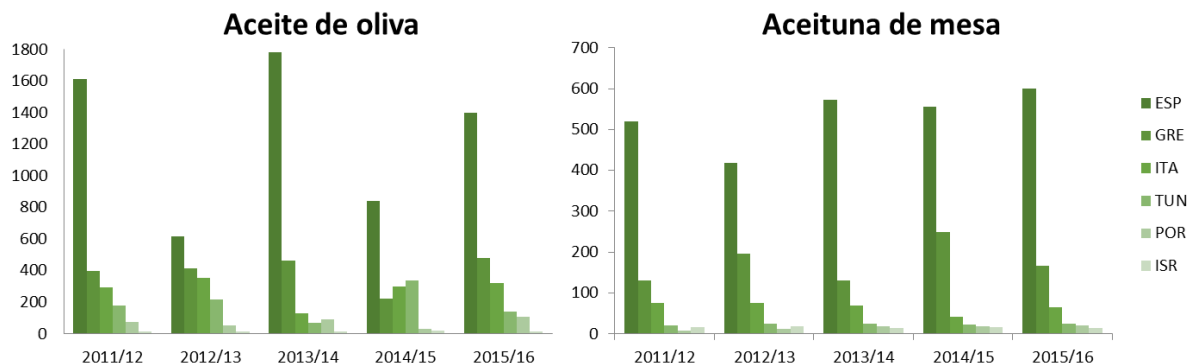


Figura 2: Datos de producción en miles de toneladas de aceite de oliva (izquierda) y aceituna de mesa (derecha) (eje de ordenadas) de los principales países productores de la cuenca Mediterránea a lo largo de las últimas campañas (eje de abscisas). En la gráfica del aceite de oliva se aprecia el carácter vecero del olivar, que se caracteriza por alternar rendimientos altos y bajos entre las distintas cosechas.

Un cultivo tan estratégico como es el del olivo ha sufrido una constante evolución y desde los años 70 los olivares españoles han experimentado una enorme transformación. Factores como la fertilización del cultivo o la introducción del riego han duplicado la producción por hectárea y mejorado la calidad del aceite de oliva en muy poco tiempo

(www.agroes.es). El olivar tradicional se ha ido abandonando y poco a poco se ha sustituido por sistemas de cultivo intensivo (entre 200 y 500 árboles por hectárea) e incluso de cultivo súper intensivo (hasta 1500 árboles por hectárea), ambos generalmente de regadío (www.esenciadeolivo.es).

También se han implantado las certificaciones del olivar, entre las que encontramos las denominaciones de origen, la producción integrada y la producción ecológica. Las denominaciones de origen buscan proteger del fraude a los aceites de oliva con reputación y gran calidad asociados a una determinada área geográfica o método de elaboración tradicional (Interprofesional del Aceite de Oliva Español). La producción integrada, con un 8% de superficie en España, certifica la producción de alimentos de alta calidad organoléptica empleando prácticas agrarias respetuosas con el ambiente, asegurando una agricultura sostenible (Real Decreto 1201/2002). El olivar ecológico, con un 4% de superficie certifica que se preserva al máximo el medio ambiente, las propiedades de los alimentos y excluye el uso de productos químicos (Guzmán *et al.* 2012).

La mosca del olivo, *Bactrocera oleae* (Rossi 1790), constituye una de las plagas más dañinas del género *Olea*. Este díptero pertenece a la familia Tephritidae, que abarca más de 4,000 especies (Foote *et al.* 1993), dentro de las cuales 350 son consideradas perjudiciales para diferentes cultivos. La distribución tradicional de esta mosca queda limitada a las áreas de cultivo del olivo, entre las latitudes 30° y 45° de ambos hemisferios, en regiones climáticas de tipo mediterráneo (Barranco. 2008). La introducción del cultivo olivarero en zonas de Australia, China y América aumenta potencialmente el área de distribución de esta plaga, que ya se ha detectado en California, México y China (Daane y Johnson 2010).



Figura 3. Hembra adulta de la especie *B. oleae*. Fuente: <http://www.comune.rivadelgarda.tn.it>

Los adultos de esta especie plaga tienen una longitud de entre 4 y 5 mm, el cuerpo de color marrón y una región amarillenta característica en el dorso. Las hembras presentan el ovíscapo al final del abdomen, una estructura visible con la que se ayudan para preparar la

cámara en el interior de la aceituna, donde dejarán los huevos (Rice 2000) (Figura 3). Pasados 2 ó 3 días después éstos eclosionan y las larvas acceden directamente al alimento. El estadio larvario dura entre 10 y 15 días, dependiendo de factores ambientales como la temperatura o la humedad. La pupación, salvo en otoño, se produce en el interior del fruto y los adultos emergen transcurridos unos 9 días (Marchini *et al.* 2017). El daño que causa este díptero está directamente relacionado con los hábitos alimenticios de las larvas, monófagas y hospedadoras de las aceitunas y, por tanto, con una dependencia absoluta del fruto en estos primeros estadios del desarrollo (Daane y Johnson 2010).

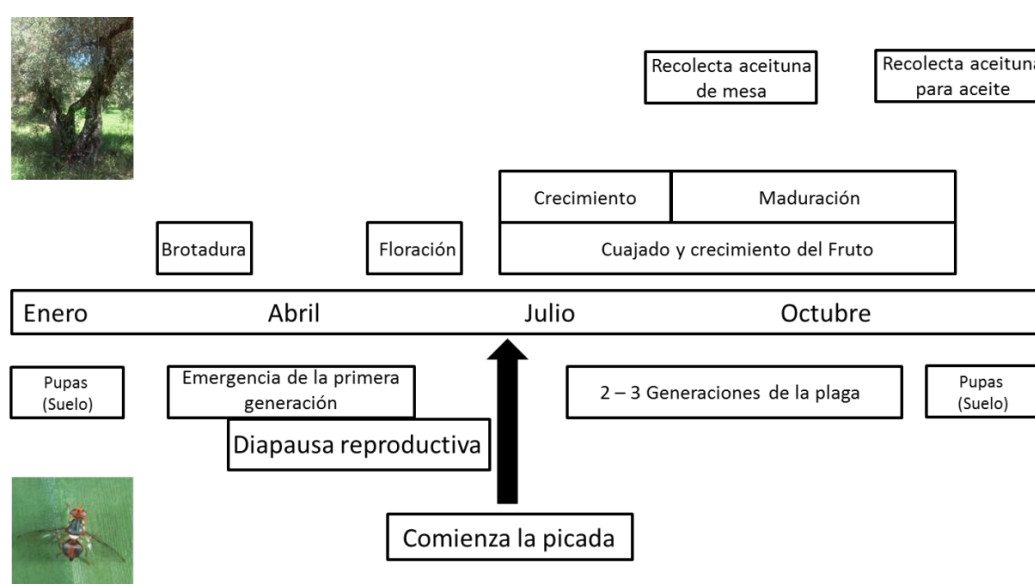


Figura 4. Esquema en el que se ilustran, de forma conjunta, las fenologías del olivo y de *Bactrocera oleae*.

B. oleae tiene de dos a cinco generaciones anuales, diferenciando entre las precoces (a partir de marzo) y las tardías (en otoño) (Figura 4). Las hembras de la primera generación (primavera) permanecen en una diapausa reproductiva hasta el mes de julio. Estos meses de primavera constituyen un cuello de botella para la especie, pues solo los individuos mejor sincronizados con el olivo serán los que depositen los huevos en las primeras aceitunas a comienzos del verano (Marchini *et al.* 2017). Las moscas del olivo de las generaciones de los meses de verano y principios de otoño completarán su ciclo biológico en la campaña de ese mismo año. Por el contrario, las larvas de finales de otoño abandonan las aceitunas lanzándose al suelo, donde se enterrarán para pasar el invierno en forma de pupa y emergerán en la primavera siguiente como adultos tras mejorar las condiciones climáticas (Collier y Van Steenwyk 2003).

Las generaciones precoces de *Bactrocera oleae* causan una pérdida casi total del fruto, ya que provocan la caída prematura de la aceituna antes de ser recolectada. Incluso las aceitunas picadas en las que finalmente no se ha depositado el huevo son susceptibles de sufrir una infección por hongos, lo que también favorece su caída (Birrun *et al.* 2009). La presencia de larvas de las generaciones tardías también produce grandes pérdidas en las variedades de olivo destinadas a la producción de aceite de oliva. Por un lado, la larva, según se alimenta disminuye el peso de la aceituna y por otro, la aparición de los hongos en las galerías que dejan las larvas a su paso aumenta la acidez del aceite, alterando sus propiedades organolépticas, lo que se traduce en una pérdida de calidad del mismo (MAPAMA). En el caso de las variedades destinadas a la producción de aceituna de mesa el daño es aún mayor, pues la oviposición implica que queden descartadas para el comercio. Así pues, la época del año en la que tiene lugar la infestación y la densidad larvaria dentro del fruto, influyen directamente en los daños ocasionados por la plaga. En España han llegado a suponer un descenso del 15% de la producción olivarera y una disminución del 25% en la calidad del aceite, lo que implica grandes pérdidas económicas (Muñoz y García 2012).

A pesar de ser una plaga capaz de infestar diferentes especies del género *Olea*, se ha observado que las hembras de *B. oleae* tienen cierta preferencia por determinadas variedades de la subespecie *O. e. europea*. Se ha podido comprobar en olivares en los que se mezclan variedades de olivo, donde el inicio de la maduración de la aceituna o la intensidad de su coloración tienen una fuerte influencia en la picada (Gonçalves *et al.* 2012). Factores como el tamaño de las aceitunas, el peso y las características físicas del endocarpo dependientes de su grado de maduración como la elasticidad, la dureza o la composición en ácidos grasos y volátiles repercuten directamente sobre la densidad de la plaga y por tanto en la cantidad y calidad del producto recolectado (Malheiro *et al.* 2015).

Teniendo en cuenta estas graves consecuencias, en los últimos años se han elaborado modelos de predicción que relacionan datos ambientales de temperatura, precipitaciones o humedad con las dinámicas poblacionales de la mosca del olivo. Esto permite alertar de los posibles picos de infestación de la plaga, favoreciendo la aplicación previa de medidas de control y asegurando su éxito (Petacchi *et al.* 2014).

El control efectivo de la mosca del olivo implica un mayor conocimiento científico de la especie y este conocimiento precisa, necesariamente, de información genética que facilite el desarrollo de métodos alternativos que deriven en prácticas agrarias eficientes y sostenibles para el ambiente.

El avance de las técnicas moleculares ha favorecido la caracterización genética de la plaga *Bactrocera oleae*. Los métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) permiten analizar la enorme cantidad de información contenida en las secuencias de DNA incrementando el conocimiento de los niveles de diversidad genética, la estructura y las dinámicas poblacionales de la mosca del olivo (Beroiz *et al.* 2012).

La secuenciación de determinadas regiones del DNA mitocondrial constituye una de las técnicas más empleadas en los estudios poblacionales. Elementos como su tasa de mutación, en algunas regiones superior a la del DNA nuclear, la herencia materna o la ausencia de recombinación lo convierten en un excelente marcador para trazar la historia evolutiva, colonizaciones o migraciones de las poblaciones de una especie (Avice 2004). Así mismo, el análisis del DNA nuclear también proporciona información acerca de la estructura genética de poblaciones. La amplificación de regiones del genoma a partir de regiones con di- o tri nucleótidos repetidos en tándem (ISSR), presenta una serie de ventajas para el desarrollo de los cebadores ya que no es preciso un conocimiento previo de la secuencia de DNA a analizar (Hernández *et al.* 2012).

A pesar de que España es el principal país productor y exportador de aceituna de mesa y aceite de oliva del mundo, sus poblaciones están pobremente caracterizadas. Resulta pues necesario emprender un estudio filogeográfico de *B.oleae* empleando marcadores mitocondriales y nucleares con especímenes procedentes de poblaciones características de toda la geografía Ibérica incluyendo, además, poblaciones del área de distribución de la plaga en el Mediterráneo. Estos estudios filogeográficos facilitan la elaboración de estrategias de control basadas en un conocimiento genético de la especie, caracterizando el flujo genético, su historia demográfica o determinando el posible origen de las introducciones en otras áreas (Roderick 1996).

En las dos últimas décadas las plagas de insectos están convirtiéndose en un problema cada vez mayor y más globalizado, y todos los indicadores llevan a pensar que este problema se irá incrementando en los próximos años. Por este motivo, toda la información genética obtenida resulta de enorme utilidad en la toma decisiones relacionadas con su control.

Los métodos clásicos de control se han revelado claramente insuficientes y con efectos secundarios indeseados. Desde mediados del siglo XX el control de la plaga se ha realizado mediante la aplicación de productos químicos (Sparks y Nauen 2014). Los organofosforados son los insecticidas de uso más extendido (MAPAMA) y su mecanismo de acción es el bloqueo de la enzima acetilcolinesterasa, lo cual produce la parálisis y muerte del insecto. Como

consecuencia del uso de los insecticidas que ejercen una gran presión de selección, en las poblaciones de *Bactrocera oleae* se ha incrementado el número de individuos portadores de mutaciones que confieren resistencia a estos productos (Vontas *et al.* 2002, Pereira-Castro *et al.* 2015).

En la actualidad, en la especie *B. oleae* hay descritas tres mutaciones relacionadas con la insensibilidad a los organofosforados en el gen *ace* que codifica la acetilcolinesterasa, dos de ellas son puntuales, en los exones IV y VII de este gen y la tercera es una delección, en el exón X (Kakani *et al.* 2013a). Las dos mutaciones puntuales reducen la capacidad del insecticida para unirse a la enzima e inutilizar el centro activo, mientras que la delección modifica la afinidad de la enzima por el fosfatidil inositol de las membranas, prolongando el anclaje de dicha enzima a la membrana celular y, por tanto, su acción (Kakani *et al.* 2008; 2011).

Teniendo en cuenta la escasa caracterización de la frecuencia y distribución de las resistencias a los insecticidas organofosforados en España y el impacto de la plaga en nuestros olivares, es esencial un análisis de la presencia de las tres mutaciones descritas en el gen *ace* en las poblaciones españolas.

Aunque el empleo de los productos fitosanitarios se encuentra altamente regulado tanto a nivel europeo (Directiva 2009/128/CE) como nacional (Real Decreto 1311/2012 recogido en el BOE-A-2012-11605), la falta de especificidad, el elevado impacto ambiental que ocasionan y el incremento de la frecuencia de alelos resistentes en las poblaciones de estas especies dañinas han impulsado la elaboración de una normativa de Gestión Integrada de Plagas (GIP). Esta gestión implica el control de las mismas priorizando el empleo de métodos naturales que minimicen el empleo de productos químicos (MAPAMA, Guía Integrada de Plagas del olivar, 2014).

Entre las medidas propuestas en las guías de gestión se encuentra el control biológico mediado por enemigos naturales presentes en el agroecosistema. La comunidad edáfica de artrópodos depredadores podría contribuir a la reducción de los niveles poblacionales de mosca del olivo durante los meses de otoño e invierno (Figura 4) (Picchi *et al.* 2016). Las larvas de las generaciones tardías pupan en el suelo, donde pasan el invierno enterradas y donde son más vulnerables de ser depredadas (Collier y Van Steenwyk 2003), por lo que disminuye de forma notable el número de adultos que llegan al período reproductivo la primavera siguiente.

El estudio de la complejidad de las redes tróficas de los ecosistemas olivareros puede ser abordado mediante marcadores moleculares específicos del DNA de la mosca del olivo en estudios *post mortem*, pues facilitan la identificación de los enemigos naturales de la plaga

(Symondson 2002). Por tanto, es necesario el desarrollo y puesta a punto de una técnica sencilla y fiable que permita detectar el DNA de la mosca del olivo en el contenido digestivo de potenciales depredadores característicos del agroecosistema. Todo ello contribuirá a un mejor conocimiento de la comunidad de artrópodos del olivar y a la selección de los mejores candidatos para el control integrado de esta plaga, con el fin de disminuir el uso de productos químicos para su control.

Considerando que uno de los objetivos prioritarios de la GIP es la necesidad de desarrollar técnicas de control que minimicen el impacto ambiental, el objetivo de este trabajo es profundizar en la caracterización genética de la especie *Bactrocera oleae*. La información que se obtenga resultará de gran utilidad y aplicación en el sector productivo con la finalidad de gestionar de una forma más eficaz la lucha contra la plaga y más respetuosa con el ambiente.

Objetivos

Para poder llevar a cabo una adecuada gestión de la mosca del olivo *Bactrocera oleae* se requiere un profundo conocimiento genético de esta especie plaga a lo largo de su área de distribución. Así mismo es sustancial determinar los enemigos naturales de la artropofauna del olivar que podrían prestar un servicio en el control integrado de plagas y conocer los puntos más vulnerables del ciclo biológico de *B. oleae* para ser depredada por éstos.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, nos hemos planteado el estudio genético de la mosca del olivo. Mediante el análisis de un gen mitocondrial y marcadores nucleares neutros abordaremos el estudio filogeográfico de *B. oleae* a lo largo de la cuenca mediterránea. Caracterizaremos la frecuencia y distribución de polimorfismos en un gen nuclear que confieren resistencias a insecticidas organofosforados en poblaciones naturales de mosca del olivo. Finalmente, tomando en consideración las recomendaciones de las GIP, en este trabajo se diseñará y pondrá a punto una técnica molecular *post mortem* que permita la identificación de los potenciales enemigos naturales de la mosca del olivo presentes en el agro-ecosistema.

Con la información obtenida pretendemos:

1. Realizar un estudio filogeográfico de las poblaciones de la mosca del olivo a lo largo de la cuenca mediterránea.
 - Evaluar los parámetros de variabilidad genética de la especie con marcadores mitocondriales y nucleares.
 - Analizar los patrones de distribución de la diversidad genética encontrada.
 - Determinar las relaciones entre las poblaciones de mosca del olivo.
 - Reconstruir la historia de *B. oleae* en la cuenca del Mediterráneo.
2. Caracterizar la frecuencia y distribución de las resistencias a insecticidas organofosforados en poblaciones naturales de mosca del olivo
 - Analizar la presencia de las mutaciones descritas en los exones IV, VII y X del gen que codifica la enzima acetilcolinesterasa relacionadas con una mayor resistencia frente a organofosforados.
 - Estudiar la frecuencia y distribución de estas mutaciones en una muestra representativa de las poblaciones españolas de la mosca del olivo, así como del resto del Mediterráneo.

3. Desarrollar un método molecular *post mortem* basado en la PCR para identificar los potenciales enemigos naturales de la mosca del olivo presentes en el agro-ecosistema.

- Diseño *in silico* de cebadores especie - específicos de DNA de la mosca del olivo.
- Puesta a punto de los cebadores diseñados para la detección de DNA de *B. oleae* mediante ensayos de especificidad y sensibilidad.
- Estudios moleculares *post mortem* de la depredación mediante ensayos de alimentación.
- Evaluación de la depredación en campo empleando el método diseñado.

Capítulo 1

Estudio filogeográfico de la mosca del olivo

Introducción

La producción olivarera, constituye un pilar fundamental del sistema agroalimentario español y la mosca del olivo, *Bactrocera oleae*, es una plaga que genera enormes pérdidas económicas a este sector (Muñoz y García 2012), por lo que resulta necesario un control efectivo de sus poblaciones. Los diferentes órganos competentes, tanto nacionales como europeos (Directiva 2009/128/CE; Real Decreto 1311/2012 recogido en el BOE-A-2012-11605), solicitan el desarrollo de alternativas de lucha integrada que limiten el uso de insecticidas, y para ello es esencial un conocimiento profundo de la especie. El conocimiento más básico es el genético, siendo la estructura genética, las dinámicas poblacionales, la variabilidad geográfica de una especie o el flujo genético aspectos fundamentales en la elaboración de estrategias de cuarentena, control o erradicación (Ochando *et al.* 2003; Singh *et al.* 2017).

La filogeografía es la disciplina que se ocupa los procesos que han gobernado la distribución geográfica de los linajes genéticos de una especie. Dicho de otro modo, las distintas poblaciones de una misma especie se estructuran genéticamente a lo largo de su distribución geográfica influidas por factores ecológicos y evolutivos que operan a una escala tanto temporal como espacial (Avice 2004). Estos estudios genéticos emplean marcadores moleculares que permiten estimar su diversidad genética, medir el flujo genético y la diferenciación de las poblaciones, rastrear las genealogías y reconstruir su historia demográfica (Purugganan y Gibson 2003).

El genoma mitocondrial, de herencia principalmente materna, haploide y sin recombinación, simplifica en gran medida la reconstrucción de las relaciones filogenéticas. Esta molécula de DNA circular y covalentemente cerrada carece de histonas que lo protejan, por lo que se ve expuesto a la acción de los radicales libres fruto de la actividad mitocondrial. Esto, ligado a una menor eficacia de los sistemas de reparación del DNA, hace que la tasa de mutación en algunas regiones de su genoma sea hasta 10 veces más alta que la del DNA nuclear. El genoma mitocondrial de *B. oleae* consta de 15.815 bases con un contenido A+T del 72.6%, tiene una organización característica del DNA mitocondrial de insectos y codifica 37 genes (13 genes codificantes, 2 RNA ribosomales y 22 RNA de transferencia) (Nardi *et al.* 2003).

En los últimos años el gen Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) es el más utilizado, pues la elevada tasa de sustitución nucleotídica de algunas de sus regiones lo convierten en un marcador molecular apropiado para estudios filogeográficos. Así mismo, es considerado una secuencia *barcode* en la identificación molecular de especies animales (Herber *et al.* 2003),

existiendo una enorme cantidad de información genética almacenada en las bases de datos de *Genbank* (Base de datos genética del *National Center for Biotechnology Information*) y *BOLD* (*Barcoding of Life Database*). Este gen codifica una enzima de estructura altamente conservada en organismos aerobios, que forma parte de la cadena de transporte electrónico, presenta distintos dominios funcionales altamente conservados y regiones de gran variabilidad (Lunt *et al.* 1996). Todo ello ha facilitado el desarrollo de cebadores que amplifican parte de este gen en un gran variedad de especies, como los denominados cebadores universales, capaces de amplificar por PCR fragmentos de este gen en más de 80 especies de invertebrados (Folmer *et al.* 1994).

La idoneidad del DNA mitocondrial para los análisis filogeográficos se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos realizados con diferentes especies animales (Matallanas *et al.* 2011; Porretta *et al.* 2012; Salvi *et al.* 2013; Froufe *et al.* 2016) y entre ellos en especies del género *Bactrocera*, como *B. depressa* (Mun *et al.* 2003), *B. curcubitae* (Hu *et al.* 2008), *B. dorsalis* (Wan *et al.* 2011) o la propia mosca del olivo (Matallanas *et al.* 2013).

No obstante, para obtener una visión más completa de la filogeografía de una especie resulta conveniente disponer de información genética proporcionada por otros marcadores, como los loci nucleares. Entre la inmensa batería de marcadores moleculares disponibles encontramos marcadores muy variables que se basan en la amplificación de fragmentos del DNA nuclear flanqueadas por secuencias microsatélites. Como cebadores se emplean secuencias complementarias a estas regiones microsatélites (*Inter Simple Sequence Repeats*, ISSR) dispersas por el genoma. Las principales ventajas de esta técnica radican en la rapidez para obtener resultados, su reproducibilidad y que no es necesario un conocimiento previo de las secuencias (Hernández 2010; Beroiz *et al.* 2008) (Figura 1F). Al amplificarse regiones no codificantes se obtiene una información en principio menos influida por la selección que los loci que codifican proteínas (Zietkiewicz *et al.* 1994). Los fragmentos amplificados tienen un tamaño comprendido entre los 100 y los 3000 pares de bases y su resolución en geles de agarosa refleja un patrón de bandas característico de individuos y poblaciones (Shlötterer 2004).

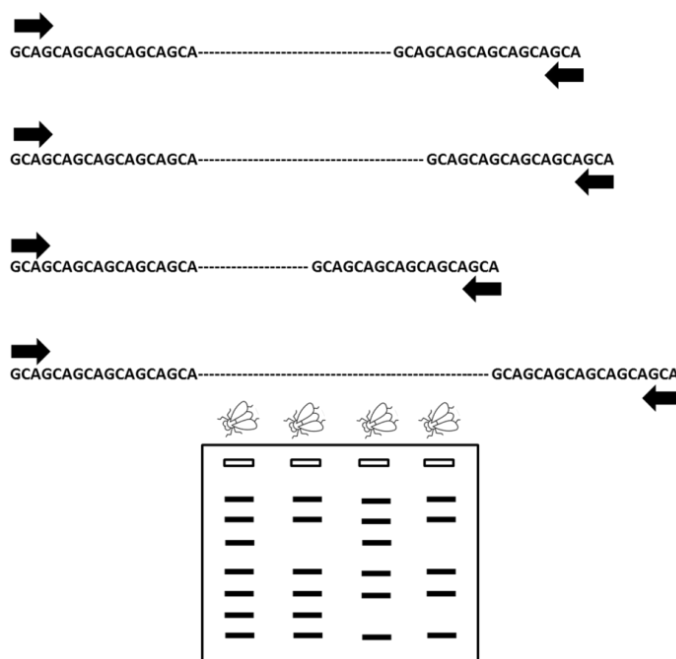


Figura 1F: Esquema de la técnica molecular basada en la amplificación de regiones repetidas del genoma (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR).

Los marcadores ISSR han resultado altamente informativos en estudios de variación genética en poblaciones de diversas especies de plantas (Lázaro *et al.* 2017; Tazeb *et al.* 2017), de animales (Sulinova *et al.* 2016; Sheikh *et al.* 2018) y entre ellos, insectos (Yang *et al.* 2015; Huala Jiménez *et al.* 2017).

En cuanto a la especie que nos ocupa, se han realizado varios estudios filogeográficos de poblaciones de la mosca del olivo del área mediterránea empleando diferentes marcadores moleculares: mitocondriales (Nardi *et al.* 2005; 2010; Matallanas *et al.* 2013; Van Asch *et al.* 2013; 2015; Dogaç *et al.* 2013), microsatélites (Augustinos *et al.* 2005; 2008; Zygouridis *et al.* 2009), e intermicrosatélites (Hernández *et al.* 2012). Estos trabajos apuntan a la existencia de varios grupos genéticos sin una clara delimitación entre los mismos. Los estudios con microsatélites realizados por Augustinos *et al.* (2005) y Zygouridis *et al.* (2009), señalaron la existencia de tres subpoblaciones de mosca del olivo: en el oeste del mediterráneo (poblaciones de Península Ibérica), en el centro (Italia y Grecia) y en el este (Chipre, Turquía e Israel). Por los bajos niveles de diversidad genética que hallaron en la Península Ibérica en comparación con las poblaciones de *Bactrocera oleae* de Italia y Grecia, plantearon una ruta de colonización del Mediterráneo de este a oeste.

En cambio, al analizar la secuencia completa del genoma mitocondrial de 21 moscas del olivo (Nardi *et al.* 2010), la subestructura detectada en el Mediterráneo variaba; la muestra de la Península Ibérica, en concreto de Portugal, era genéticamente más similar a las del norte de África e Italia mientras que las poblaciones de Israel y Turquía constituían un grupo genético diferente.

En todos los trabajos mencionados, la caracterización de las poblaciones españolas de *B. oleae* ha sido limitada, pues incluían pocos individuos a pesar de la extensión dedicada a la producción olivarera en nuestro país. Tan sólo los estudios realizados por nuestro equipo recogen mayor información genética sobre las poblaciones de mosca del olivo de España. Un análisis con marcadores RAPD (Segura *et al.* 2008) puso de manifiesto la notable diversidad genética presente en las poblaciones de esta especie monófaga, la ausencia de diferenciación entre las muestras españolas, incluso entre las poblaciones del norte del Mediterráneo, la similitud genética de las poblaciones de EEUU con estas muestras, que señalaba un posible origen mediterráneo de la plaga y cierta diferenciación de la población de Túnez. El primer abordaje con ISSR de cuatro poblaciones (Hernández *et al.* 2012) reveló una elevada variabilidad genética y una escasa diferenciación genética entre ellas. El estudio más amplio, efectuado con otro marcador, DNA mitocondrial, en 50 moscas del olivo arrojó unos parámetros de diversidad muy elevados y apenas diferenciación entre ellas (Matallanas *et al.* 2013) pero sí con la población muestreada en Túnez e Italia.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el objetivo de este capítulo es profundizar en el conocimiento filogeográfico de esta plaga en la Península Ibérica, realizando, hasta ahora, el estudio más exhaustivo con 18 poblaciones representativas de toda la geografía peninsular y por primera vez, empleando dos tipos de marcadores, mitocondriales y nucleares. Para enmarcar este estudio en el área mediterránea e inferir la posible historia demográfica de la especie y las posibles rutas de colonización de la cuenca del Mediterráneo, se incluyeron muestras de otras 10 poblaciones, recogidas en Italia, Israel, Grecia y Túnez.

Dada la utilidad de los marcadores mitocondriales, el presente estudio se abordó analizando un fragmento de unas 1200 pb del gen mitocondrial COI. Así mismo, como marcadores nucleares se seleccionaron secuencias ISSR, que han resultado altamente informativos en estudios poblacionales de muy diferentes especies como a se ha comentado.

Toda la información obtenida en este estudio filogeográfico podría ser de utilidad si se quiere caracterizar la estructura y las dinámicas poblacionales de los insectos plaga con el fin de incrementar la eficacia de los métodos de lucha frente a ellos, como es el caso de la mosca del olivo que ocasiona un considerable impacto económico en el sector productivo español.

Material

En el estudio filogeográfico las muestras procedían de 16 localidades características de la distribución del olivar español y de 12 localidades de regiones productoras del área mediterránea; en total 28 poblaciones de 6 países diferentes (Tabla 1F, Figura 2F). Las aceitunas infestadas recogidas en el campo eran llevadas al laboratorio, donde las larvas se mantenían en cámaras climáticas hasta la emergencia de los adultos, que se congelaron a -80°C. En otros casos, los adultos se recibían en etanol (70%) y se mantenían a 4°C hasta la posterior extracción del DNA.

CÓDIGO	LOCALIDAD/PAÍS	LATITUD	LONGITUD	A. Mol
BAD	Montemolín, Badajoz, ES	38.1552	-6.2069	Mit / ISSR
BAL	Mallorca, Islas Baleares, ES	39.6952	3.0175	Mit / ISSR
BAR	Villafranca del Penedés, Barcelona ES	41.3450	1.6998	ISSR
CAC	Castañar de Ibor, Cáceres, ES	39.6277	-5.4166	Mit / ISSR
COR	Campus de Rabanales, Córdoba, ES	37.2647	-4.6327	Mit / ISSR
GER	El Cortalet, Gerona, ES	42.2253	3.0970	Mit / ISSR
GRA	Íllora, Granada, ES	37.3461	-3.8727	Mit / ISSR
JAE	La Iruela, Jaén, ES	37.9469	-2.9583	Mit / ISSR
MAD	Morata de Tajuña, Madrid, ES	40.2275	-3.4369	Mit / ISSR
MAL	Ronda, Málaga, ES	36.6587	-4.7603	Mit / ISSR
NAV	Arróniz, Navarra, ES	42.4222	-2.0913	Mit / ISSR
SAL1	Aldeadávila de la Ribera, Salamanca, ES	41.2183	-6.62	Mit / ISSR
SAL2	Lagunilla, Salamanca, ES	40.3246	-5.9687	Mit / ISSR
TAR	Tortosa, Tarragona, ES	40.811	0.5209	Mit / ISSR
TER	La Portellada, Teruel, ES	40.89	-0.0336	Mit
VAL	Requena, Valencia, ES	39.4878	-1.1003	Mit
POR1	Fundao, PT	40.1369	-7.4994	Mit
POR2	Lisboa, PT	38.7069	-9.1356	Mit / ISSR
ITA	Diana Marina, Liguria, IT	43.9098	8.0818	Mit / ISSR
TUN1	SidiThabet, TN	36.9081	10.0222	Mit / ISSR
TUN2	Tunisia, TN	36.7916	10.0634	Mit
TUN3	Zarzis, TN	33.523	11.0852	Mit / ISSR
GRE1	Agia, GR	39.7188	22.7550	Mit
GRE2	Tesalonica, GR	40.6393	22.9446	Mit / ISSR
GRE3	Atenas, GR	37.9791	23.7166	Mit / ISSR
ISR1	Jerusalem, IL	31.7383	35.2137	Mit / ISSR
ISR2	Rehovot, IL	31.8927	34.8112	Mit / ISSR
ISR3	Lahav Forest, IL	31.3725	34.8408	Mit

Tabla 1F: Poblaciones de *B. oleae* empleadas en el estudio filogeográfico. ES: España, PT: Portugal, TN: Túnez, GR: Grecia, IL: Israel. A. Mol: Análisis molecular.

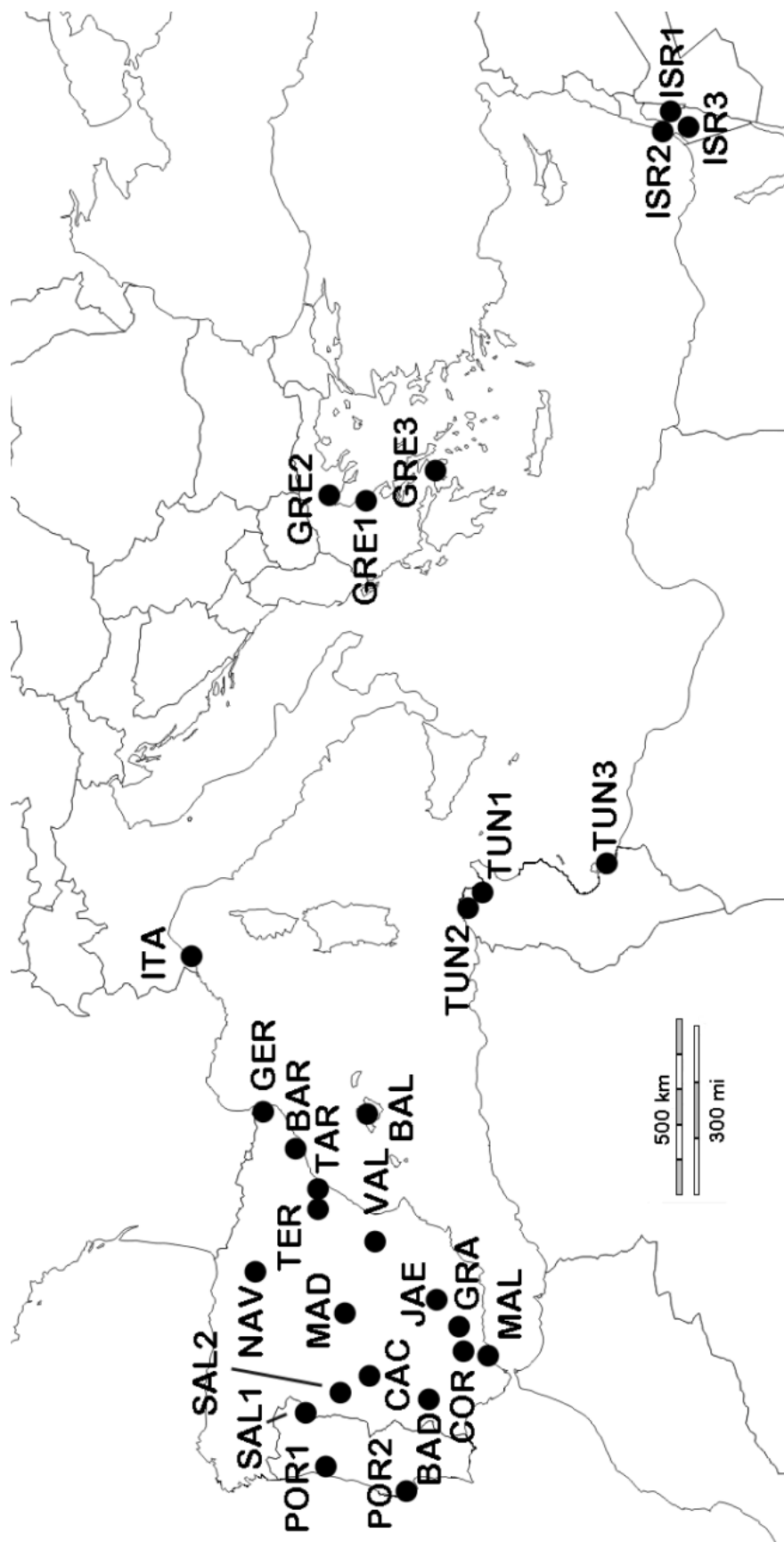


Figura 2F. Mapa con las poblaciones de *Bactrocera oleae* muestreadas.

Métodos

1. Extracción del DNA:

El DNA genómico se extrajo a partir del adulto completo empleando el *DNeasyBlood and Tissue kit*, Qiagen (Valencia, CA, EEUU). Se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante incluyendo pequeñas modificaciones, como el tratamiento con RNasa A, lo que supuso una incubación de las muestras a 37°C durante 30 minutos antes de proceder al lavado del DNA. El DNA limpio se eluyó en un volumen de 90 µl de tampón TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8 y EDTA 1mM pH 8) y se conservó a -20°C hasta su posterior análisis.

La integridad del DNA extraído, material de partida para los análisis genéticos, se valoró en electroforesis horizontales en geles de agarosa al 0.8% en tampón TBE 0.5X (Tris-Borato 0.045 M, EDTA 0.001 M, pH8) teñidos con bromuro de etidio (1 µg / mL). Como patrón de peso molecular se empleó el Fago Lambda digerido con *Hind*III (50 ng / µL). Los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Quantum ST5, Labtech) y se obtuvieron las imágenes con una cámara acoplada a un sistema de captura y análisis de imágenes (VisionCapt V16.08) (Figura 3F).

Igualmente se estimó la concentración del DNA genómico por espectrofotometría valorando la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop®ND-100 (Nanodrop Technologies, Willmington, EEUU). Por último, empleando tampón TE 10:1 se realizaron diluciones de DNA a 5ng / µL y 1.5 ng / µL, que también se conservaron a -20°C.

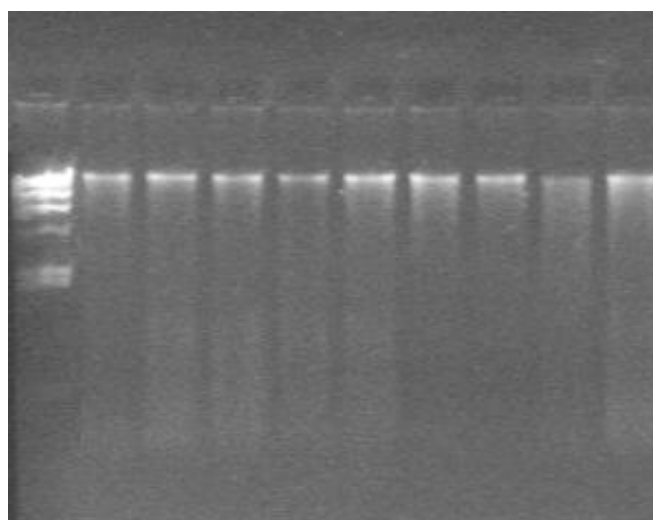


Figura 3F: Electroforesis de DNA en gel de agarosa. Calle 1: Marcador de peso molecular λ *Hind*III. Calles 2-10: DNA genómico de *B. oleae*.

2. Análisis del DNA mitocondrial para el estudio filogeográfico

2.1 Amplificación del DNA

Se ha amplificado por PCR un fragmento de aproximadamente 1,200 pb del gen COI empleando los cebadores C/N2769 (Gopurenko *et al.* 1999) y LCO1490 (Folmer *et al.* 1994). La mezcla de reacción, en un volumen de 12.5 µL, contenía 0.64 µM de cada cebador, tampón 10X, 2mM de MgSO₄, 200 µM de cada uno de los dNTP, 0.2 unidades de la polimerasa de alta fidelidad Vent® DNA *polymerase* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) y 10 ng de DNA genómico de mosca del olivo.

El programa de PCR se inició con un paso de desnaturalización del DNA a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos que incluían 45 segundos de desnaturalización a 94°C, un minuto a 60°C de hibridación de los cebadores y un minuto a 72°C de elongación. El programa concluía con un paso de elongación final de 10 minutos a 72°C. Todas las amplificaciones se desarrollaron en un termociclador SENSOQUEST labcycler (Goettingen, Alemania).

Los amplicones se resolvieron en electroforesis horizontales con geles de agarosa al 1% con TBE 0.5X teñidos con bromuro de etidio (1 µg / mL). Las muestras se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Quantum ST5, Labtech) y las imágenes se obtuvieron mediante una cámara acoplada a un sistema de captura y análisis de imágenes (VisionCapt V16.08). Los productos de PCR sirvieron como molde para las reacciones de secuenciación. Para ello, se purificaron enzimáticamente con 1 unidad de fosfatasa alcalina (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1u/ µL) y 1.4 unidades de exonucleasa (Exonuclease I 20 u/ µL) (Thermo Fisher Scientific, Inc. EEUU). La reacción enzimática incluyó un periodo de incubación de 30 minutos a 37°C seguido de 20 minutos a 80°C para inactivar las enzimas.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un secuenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Inc. EEUU) en el Centro de Apoyo a la Investigación de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Los cebadores utilizados en la secuenciación fueron los mismos que los usados en las reacciones de amplificación (C/N2769 y LCO 1490).

2.2 Alineamiento y edición de secuencias mitocondriales

Las secuencias de nucleótidos obtenidas con cada cebador se editaron con el programa BioEdit v7.0.9.0 (Hall 1999). Todos los electrofenogramas o cromatogramas fueron revisados con Chromas Lite 2.1.1 para descartar la presencia de picos dobles y se tradujeron a proteína, empleando el código genético mitocondrial de invertebrados incluido en el programa MEGA v5.05. (Kumar *et al.* 2011). El fin fue asegurar que las secuencias obtenidas eran mitocondriales y no pseudogenes mitocondriales nucleares (*numts*) y revisar y descartar codones de fin inesperados e inserciones y deleciones (*indels*) (Buhay 2009). Tras la edición, todas las secuencias obtenidas tuvieron una longitud final de 1151 pb y se compararon con las depositadas en las bases de datos del GenBank empleando el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul *et al.* 1997) para confirmar que correspondían al gen mitocondrial COI de *Bactrocera oleae*.

El conjunto de secuencias se alineó con el algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1997) incluido en BioEdit, el cual efectúa un alineamiento múltiple progresivo. Primero, alineando las secuencias de mayor similitud y añadiendo después las demás. A partir de la matriz de secuencias se calcularon los distintos parámetros filogeográficos y se realizaron los análisis filogenéticos.

2.3 Parámetros de variabilidad genética y estructura poblacional

Los parámetros de diversidad genética: número de haplotipos (*h*), diversidad haplotípica (*H*), diversidad nucleotídica (π) y el número de sitios polimórficos (*S*) se estimaron empleando el programa DNAsp v4.50.3 (Rozas *et al.* 2008).

La distribución geográfica de la variabilidad genética encontrada en las poblaciones se representó con la aplicación *web* PhyloGeoViz v2.4.5. (Tsai 2011). Este programa permitió visualizar la distribución espacial de los haplotipos y sus frecuencias en cada población mediante gráficos de sectores dispuestos sobre las coordenadas geográficas de las poblaciones muestreadas.

Para inferir la estructura genética de las poblaciones de *B. oleae* se calcularon los índices de fijación F_{ST} (Slatkin 1995). Estos índices se basan en las diferencias entre las secuencias de DNA dentro de cada una de las subpoblaciones y la población completa y fueron calculados con el programa Arlequin v.3.11 (Excoffier *et al.* 2005) con la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = 1 - H_w / H_b$$

Donde H_w es el número medio de diferencias encontradas entre las secuencias de una misma población y H_b el número medio de diferencias nucleotídicas entre las secuencias de diferentes poblaciones. Los valores de F_{ST} oscilan entre 0 y 1, correspondiéndose con poblaciones sin diferenciación genética o poblaciones totalmente diferenciadas. Los niveles de significación estadística se estimaron con la aplicación secuencial de las correcciones de Bonferroni (Rice 1989).

A partir de los valores de F_{ST} se calculó la tasa efectiva de migración (N_m), cuya estima en genomas haploides es:

$$N_m \approx \frac{1}{2} [(1 / F_{ST}) - 1]$$

Los valores de N_m inferiores a 1 indican que apenas existe flujo genético y que el principal factor que actúa sobre esas poblaciones es la deriva génica. Cuando N_m es superior a 1, los efectos de la deriva y la diferenciación local se ven contrarrestados por el flujo génico entre poblaciones. Valores superiores a 4 indican que las poblaciones analizadas se comportan como una única población panmíctica.

Para visualizar de un modo gráfico las tendencias de variación y las relaciones entre las poblaciones de mosca del olivo en la cuenca del Mediterráneo se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) empleando los índices F_{ST} . De este modo se pudo establecer el número de coordenadas necesarias para explicar el 100% de la variación de la muestra así como el porcentaje de variación que absorbe cada uno de los ejes. Las coordenadas se proyectaron en un gráfico de dos dimensiones representándose las principales tendencias de variación. Este análisis se realizó con el paquete NTSYSpc v2.10q (Rohlf 2000).

Los Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) se efectuaron con el programa Arlequin v.3.5.12 (Excoffier *et al.* 2005), estableciendo distintos niveles jerárquicos: varianza de las diferencias entre los individuos de una misma población, entre individuos de distintas poblaciones, pero pertenecientes a un mismo grupo y entre individuos de diferentes grupos. Los niveles de significación de los componentes de la varianza molecular se calcularon por procedimientos permutacionales no paramétricos (en este caso concreto, usando 10,000 permutaciones al azar).

Para profundizar en los patrones de divergencia genética, también se llevó a cabo un Análisis Espacial de la Varianza Molecular (SAMOVA 2.0. Dupanloup *et al.* 2002). Este análisis define grupos homogéneos maximizando la proporción de varianza genética debida a las diferencias entre los grupos de poblaciones. Los análisis se efectuaron con particiones

arbitrarias e independientes de las 27 poblaciones en distintos grupos ($k=2-6$). La simulación que muestre el valor de índice F_{CT} más elevado indicará el número de grupos más probable dentro de la muestra.

Las redes de haplotipos o *networks* permiten visualizar de un modo más detallado las relaciones genéticas de los individuos conespecíficos. En estas representaciones reticuladas los diferentes haplotipos quedan interconectados entre sí indicándose el número de saltos mutacionales que los separan. Del mismo modo, se detectan secuencias consenso que se interpretan como haplotipos no muestreados, pero posiblemente existentes. La red de unión de medianas de los haplotipos de *Bactrocera oleae* se generó con *Network* v4.6 (<http://www.flexus-engineering.com>).

Así mismo, para tener una visión más amplia de la estructura genética de *B. oleae* se repitió la *Network* incorporando en nuestro estudio las secuencias de individuos de la misma especie descargadas del GenBank con los códigos de acceso GU108459-GU108479 (Nardi *et al.* 2010) y HQ677155 – HQ677162 (Frey *et al.* 2013) y descartando los haplotipos exclusivos, es decir, presentes en un único individuo. Así mismo, se incluyó una secuencia de *Bactrocera dorsalis* como miembro fuera de grupo con el código de acceso DQ 845759 (Yu *et al.* 2007).

Las aproximaciones filogenéticas clásicas también se utilizaron para reconstruir las relaciones entre los haplotipos, en concreto el vecino más próximo (NJ), la máxima parsimonia (MP) y la inferencia bayesiana (IB).

El método NJ está basado en distancias genéticas y requiere el cálculo de las mismas entre los pares de OTU (*Operational Taxonomic Unit*). Las distancias genéticas se obtuvieron con el método Kimura 2 Parámetros y la significación se realizó a partir de 1,000 réplicas empleando el programa Mega v.5. (Tamura *et al.* 2011).

Los métodos de Máxima Parsimonia (MP) seleccionan los árboles que requieren el menor número de cambios evolutivos, es decir, los más parsimoniosos para explicar las diferencias entre las OTU. Del conjunto de sitios polimórficos de las secuencias, solo son informativos aquellos en los que hay dos nucleótidos distintos en al menos dos de las OTU estudiadas. Los análisis se realizaron con el programa TNT v.1.1 (Goloboff *et al.* 2008) empleando el método TBR (*Tree-Bisection-Reconnection*) de búsqueda heurística con 1,000 réplicas y adición gradual de secuencias al azar. El árbol consenso se obtuvo a partir de la opción *majority rule* que ofrece el programa con 1,000 repeticiones de *bootstrap*.

Con la inferencia bayesiana (BI) se genera un set de los mejores árboles con la totalidad de las posibles distribuciones de probabilidades considerando el conjunto de datos observados y un modelo de evolución nucleotídica previamente especificado. La selección del modelo de sustitución nucleotídica GTR+G al que se ajustan los datos mitocondriales se realizó con jModeltest v3.4 (Posada *et al.* 1998). Los análisis bayesianos se realizaron con el programa Mr. Bayes v3.2 (Ronquist *et al.* 2011) empleando el método Métropolis acoplado a las cadenas de Markov-Monte Carlo con 2,000,000 de iteraciones (generaciones), dos carreras (cuatro por ejecución) y un *burn-in* del 10%. La convergencia de las cadenas se aseguró analizando el parámetro SDSF (*Standard Deviation of Split Frequencies*).

Todos los árboles que se obtuvieron empleando las tres aproximaciones filogenéticas se visualizaron mediante el programa FigTree v1.3.1. (Rambaut 2010).

2.4 Inferencias demográficas

La historia demográfica de las poblaciones de *Bactrocera oleae* en el Mediterráneo se ha inferido mediante un análisis de la distribución de *mismatch* o de las frecuencias de las diferencias entre pares de secuencias (Rogers y Harpending 1992; Slatkin y Hudson 1991). Las poblaciones con un tamaño constante a lo largo del tiempo reflejarán una distribución multimodal mientras que aquellas que hayan experimentado expansiones demográficas repentinas tendrán una distribución unimodal a la izquierda (Rogers y Harpending 1992). La concordancia de nuestros datos con ambos modelos se comprobó con la aproximación de mínimos cuadrados (Schneider y Excoffier 1999) implementada en Arlequin v.3.11.

Con el programa DNAsp v4.50. se han calculado los estadísticos de neutralismo R_2 (Ramos-Onsins y Rozas 2002), D de Tajima (Tajima 1989) y F_s de Fu (Fu 1997), basados en la teoría de la coalescencia. Los parámetros R_2 y D de Tajima emplean información sobre la frecuencia de las mutaciones y el estadístico F_s de Fu utiliza la información contenida en la distribución de los haplotipos.

Tras comprobar el ajuste de los datos a modelos de expansión se calculó t_e , o tiempo en generaciones transcurrido desde la última expansión con la siguiente fórmula.

$$\tau = 2ut_e$$

Donde Tau (τ), es un indicador del tiempo transcurrido desde la expansión medido en unidades de tiempo evolutivo (Slatkin y Hudson 1991) y obtenido a partir de las distribuciones *mismatch*. La tasa de divergencia por nucleótido y año (u) procede de la expresión $u = \mu k$, donde μ representa la tasa de sustitución nucleotídica en esa región del DNA y k la longitud de

la secuencia. La conversión de los años transcurridos desde la última expansión de la especie se realizó considerando una tasa de mutación del gen COI de insectos del 2.3% por millón de años (Bowers 1994). El valor de la tasa de generación para la especie *Bactrocera oleae* fue de 0.25 años (Nardi *et al.* 2010).

3. Análisis de marcadores nucleares ISSR

Se analizaron 363 ejemplares procedentes de 16 poblaciones del área Mediterránea (Tabla 1F), empleándose entre 16 y 23 individuos por población.

3.1 Amplificación

Las amplificaciones del ADN nuclear se llevaron a cabo con 5 cebadores UBC (Universidad Británica de Columbia, Tabla 2F). El volumen final de cada reacción de amplificación fue de 10 µL. Las mezclas contenían 2 pmol de cada cebador, 10 ng de DNA y 5 µL de Taq PCR Master Mix 2X (200 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂, tampón 1X y 0.25 unidades de Taq DNA polimerasa) (Qiagen, Valencia, CA, EEUU).

El programa de PCR incluía un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos seguido de 45 ciclos de 94°C durante 1 minuto, un minuto a la correspondiente temperatura de hibridación de cada cebador (Tabla 2F) y 72°C durante 4 minutos. La PCR concluía tras un período de elongación final de 10 minutos a 72°C. Todas las amplificaciones se desarrollaron en un termociclador SENSOQUEST labcycler (Goettingen, Alemania).

Cebador	Secuencia	T (°C)
817	5' CACACACACACACACAA 3'	45
818	5' CACACACACACACACAG 3'	52
830	5' TGTGTGTGTGTGTGTGG 3'	52
849	5' GTGTGTGTGTGTGTGTYA 3'	50
855	5' ACACACACACACACACYT 3'	52

Tabla 2F. Cebadores ISSR empleados en las distintas amplificaciones de DNA de *B. oleae*. T, temperatura de hibridación.

Los productos amplificados se resolvieron en geles de agarosa al 2% con TBE (0.5X) teñidos con bromuro de etidio (1 µL /mL). Los tamaños de los fragmentos se estimaron según su co-migración con un marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp Ladder Plus, MBI, Fermentas). Los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Quantum

ST5, Labtech) y se obtuvieron las imágenes con una cámara acoplada a un sistema de captura y análisis de imágenes (VisionCapt V16.08) (Figura 2F). Todas las amplificaciones se repitieron para constatar que los patrones de ISSR obtenidos eran reproducibles y en todas se incluyó un control negativo.

3.2 Análisis de los patrones de ISSR

En cada individuo se determinó la presencia (1) o ausencia (0) de bandas con cada uno de los cebadores empleados. De este modo se generó una matriz con un total de 36 bandas fruto de la amplificación con los 5 cebadores. Estas bandas de DNA se analizaron asumiendo las siguientes condiciones:

- Que se trata de marcadores dominantes con segregación mendeliana.
- Las frecuencias genotípicas guardan las proporciones de Hardy- Weinberg.
- Todos los alelos recesivos (indicados como ausencia de banda) son iguales en estado, es decir, proceden de una misma mutación. Ocurre lo mismo con los alelos dominantes (indicados como presencia de banda).
- Que son loci bialélicos: ausencia y presencia de banda.

Teniendo en cuenta estas premisas se determinaron los parámetros de diversidad genética mediante el programa Popgene 1.32 (Yeh *et al.* 1999) infiriendo:

- Numero observado de alelos (Kimura y Crow 1964)
- Número efectivo de alelos (Kimura y Crow 1964)
- Polimorfismo, basado en el criterio del 95%: porcentaje de loci (bandas) polimórficos. Un locus es polimórfico cuando la frecuencia del alelo más frecuente de la población es inferior o igual a 0.95, oscilando el valor de P entre 0 y 1.

$$P = \text{Nº loci polimórficos} / \text{Total de loci.}$$

- Heterocigosidad esperada.
- Diversidad genética de Nei (Nei 1978).
- Índice de Shannon (Lewontin 1972): Grado de diversidad genética, donde H_0 es el cociente entre la diversidad media dentro de las poblaciones y la diversidad total.

$$H_0 = -\sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i$$

A partir de la matriz de distancias de Nei (Nei 1972) se realizó un análisis de componentes principales para ver gráficamente las principales tendencias de variación de las

poblaciones. De esta forma se determina el número de factores o componentes necesarios para explicar el 100% de la variación, así como el porcentaje de variación que absorbe cada una de ellas.

Los niveles de variación de la diversidad genética se caracterizaron gracias a un Análisis de la Varianza Molecular, AMOVA, (Excoffier *et al.* 1992) con el programa Arlequin v.3.11. Los niveles de significación de los componentes de la varianza se calcularon por procedimientos permutacionales no paramétricos (1,000 permutaciones al azar).

Con este mismo programa, y a partir de la matriz de presencia – ausencia de bandas se realizaron las estimas de diferenciación genética (F_{ST}) y de la tasa efectiva de migración (Nm) por medio de la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = 1 / (1 + 4Nm)$$

Finalmente se estimaron las distancias de Nei (1972) aplicando las correcciones de Lynch y Milligan (1994) para marcadores dominantes mediante el programa RAPDDIST, del paquete informático RAPD-PCR. El cálculo de estas distancias se basa en las frecuencias alélicas. La matriz de distancias genéticas se utilizó para construir un dendrograma por medio del método del vecino más próximo (NJ) utilizando el programa PHYLIP versión 3.68 (Felsenstein, 2005). El método NJ se basa en encontrar pares de OTUs (Operational Taxonomic Units, es decir, unidades taxonómicas operativas) que minimicen la longitud total de las ramas del árbol en cada paso del agrupamiento, partiendo de un árbol en forma de estrella. En la reconstrucción del árbol se agrupan aquellas unidades taxonómicas con menor distancia entre sí y, tras recalcular las que restan, se repite el proceso. Las estimas de las longitudes de las ramas se obtienen por el método de los mínimos cuadrados. Para realizar el árbol se llevó a cabo un análisis de bootstrap (1,000 réplicas) para comprobar la fiabilidad de los agrupamientos obtenidos y se visualizaron mediante el programa FigTree v1.3.1. (Rambaut 2010).

Resultados

1. Análisis de la secuencia del gen COI

Se han analizado 154 individuos de la especie, *Bactrocera oleae*, plaga del olivo, de 16 poblaciones de España y 2 de Portugal. Así mismo se incluyeron 10 poblaciones procedentes de otros 4 países productores y exportadores de aceituna de mesa y aceite de oliva del Mediterráneo; en total, 252 especímenes (Tabla 1F y Figura 2F).

El estudio de las 1151 bases del gen mitocondrial que codifica la enzima Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) identificó 60 sitios polimórficos, donde 19 resultaron informativos desde el punto de vista de la parsimonia. De todos los *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*) encontrados, 49 fueron transiciones y 11 transversiones, éstas a muy baja frecuencia. La mayoría de estos cambios, 43, se produjeron en la tercera base del codón, tan solo cinco tuvieron lugar en la segunda y los doce restantes en la primera. El 73.3% de los cambios en la secuencia de DNA fueron mutaciones de naturaleza silenciosa, en el 11.6% fue conservativo (se mantiene la polaridad del aminoácido) y en el 15.1% no conservativo.

Estos 60 sitios polimórficos definieron 73 haplotipos (Tabla 3F) cuyas secuencias fueron depositadas en las bases de datos del *Genbank* con los números de acceso KC005742-KC005762, KP704354-KP704404 y JX073648. El haplotipo más frecuente ha sido H1 (24%), identificado en 62 individuos, el segundo, el haplotipo H17, presente en 33 especímenes (13%), seguido de H2 (7.7%), H21 (6.5%), H15 y H22 (ambos 6.2%). Estos seis haplotipos H1, H2, H15, H17, H21 y H22, englobaron el 63.56 % de las moscas del olivo de la cuenca mediterránea. El resto de los haplotipos se encontraron a muy baja frecuencia y 52 de ellos estaban presentes solo en un individuo.

[illegible]

48

Parámetros de variabilidad genética y estructura poblacional

Los parámetros de variabilidad genética se muestran en la Tabla 4F. El especial esfuerzo de muestreo realizado en la Península Ibérica, con 154 individuos de 17 poblaciones de mosca del olivo permitió identificar 54 de los 73 haplotipos detectados y unos valores de diversidad genética elevados (Hd : 0.86, k : 1.763, π : 0.00153). Las poblaciones de Badajoz (BAD) y Córdoba (COR) presentaron el mayor número de sitios polimórficos (s : 9) y de diversidad haplotípica, Hd : 0.955 y 0.933 respectivamente. Por el contrario, la población procedente de Tarragona (TAR) reflejó los parámetros de diversidad más bajos, Hd : 0.644 y π : 0.00089, y solo 3 sitios polimórficos definiendo 4 haplotipos.

El análisis de estos parámetros en el resto de poblaciones también mostró unos valores altos de diversidad, destacando el número de haplotipos identificados (8) en las poblaciones de Túnez 1 (TUN1) y Grecia 2 (GRE2) y sus valores elevados del parámetro k (número medio de nucleótidos diferentes), de 3.2 y 2.711 respectivamente. La probabilidad de que dos secuencias tomadas al azar difieran en un único nucleótido, π , tuvo su mínimo en Túnez 3 (TUN3, π : 0.00077) e Israel 2 (ISR2, π : 0.00096) y el máximo en Túnez 2 (TUN2, π : 0.00278). Finalmente, los valores de diversidad haplotípica más elevados se encontraron en las poblaciones de Grecia 1 (GRE1, Hd : 0.844) e Israel 1 (ISR1, Hd : 0.822), y la población de *Bactrocera oleae* italiana (ITA) la que reflejó la menor diversidad haplotípica (0.533).

En definitiva, el análisis de todas estas estimas en las 27 poblaciones de *B. oleae* caracterizadas arrojó unos valores muy elevados de diversidad genética, destacando las poblaciones peninsulares de Badajoz (BAD) y Córdoba (COR). En cambio, las poblaciones que reflejaron los valores de más bajos para la mayoría de los parámetros fueron Túnez 3 (TUN3) e Israel 2 (ISR2).

POP	<i>s</i>	<i>h</i>	<i>K</i>	<i>Hd</i>	π	N
BAD	9	8	2.400	0.955	0.00209	10
BAL	4	5	1.288	0.822	0.00112	10
CAC	7	7	1.822	0.911	0.00158	10
COR	9	8	1.955	0.933	0.00170	10
GER	8	7	1.866	0.911	0.00162	10
JAE	6	5	1.777	0.755	0.00154	10
MAD	6	6	1.490	0.872	0.00130	11
MAL	6	6	1.345	0.800	0.00117	11
NAV	5	6	1.311	0.844	0.00114	10
SAL1	8	6	1.733	0.888	0.00176	10
SAL2	6	7	2.218	0.911	0.00151	10
TAR	3	4	1.022	0.644	0.00089	10
TER	8	6	1.777	0.833	0.00154	9
VAL	6	5	2.000	0.933	0.00174	6
POR1	5	5	1.809	0.904	0.00157	7
POR2	7	4	2.333	0.800	0.00230	10
P. Ibérica	48	54	1.763	0.864	0.00153	154
ITA	5	4	1.311	0.533	0.00114	10
TUN1	8	4	2.377	0.644	0.00207	10
TUN2	6	3	3.200	0.800	0.00278	6
TUN3	2	3	0.888	0.711	0.00077	10
GRE1	8	6	2.711	0.844	0.00236	10
GRE2	7	5	2.222	0.805	0.00193	10
GRE3	5	4	1.422	0.644	0.00124	9
ISR1	5	5	1.844	0.822	0.00160	10
ISR2	3	4	1.106	0.757	0.00096	12
ISR3	7	7	1.963	0.818	0.00171	11
MED	60	73	2.982	0.908	0.00259	252

Tabla 4F: Parámetros de variabilidad genética del gen COI en las poblaciones de *B. oleae* *s*: número de sitios polimórficos; *h*: número de haplotipos; *K*: número medio de nucleótidos diferentes; *Hd*: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica; N: individuos analizados en la población.

La diversidad haplotípica detectada en las poblaciones de *Bactrocera oleae* se representó sobre un mapa con diagramas de sectores dispuestos sobre las coordenadas geográficas de cada una de las poblaciones analizadas (Figura 4F). Teniendo en cuenta el exceso de haplotipos exclusivos, es decir, presentes solo en un individuo, y para facilitar la comprensión de la figura, éstos se representaron en color negro. Como se puede apreciar en ella, la distribución de los haplotipos a lo largo de la cuenca mediterránea no es homogénea y refleja un marcado patrón geográfico. El haplotipo H1 (24%) es característico de las poblaciones de España, Portugal, Túnez (TUN1, TUN3) y Grecia (GRE1). El haplotipo H17 (13%) es el que presentó una distribución más amplia, se encontró en poblaciones de España y en todas las de Túnez, Italia y Grecia. Los haplotipos H2 (7.7%) y H15 (6.2%) son característicos de las regiones más occidentales del mediterráneo, en concreto de las poblaciones de España y Portugal (H2) y España y Túnez (H15). Por el contrario, H22 (6.2%), se detectó en todas las poblaciones orientales de mosca del olivo, en Grecia e Israel, y H21 (6.5%) en Israel, Grecia (GRE1) y en dos poblaciones de Túnez (TUN1 y TUN2).

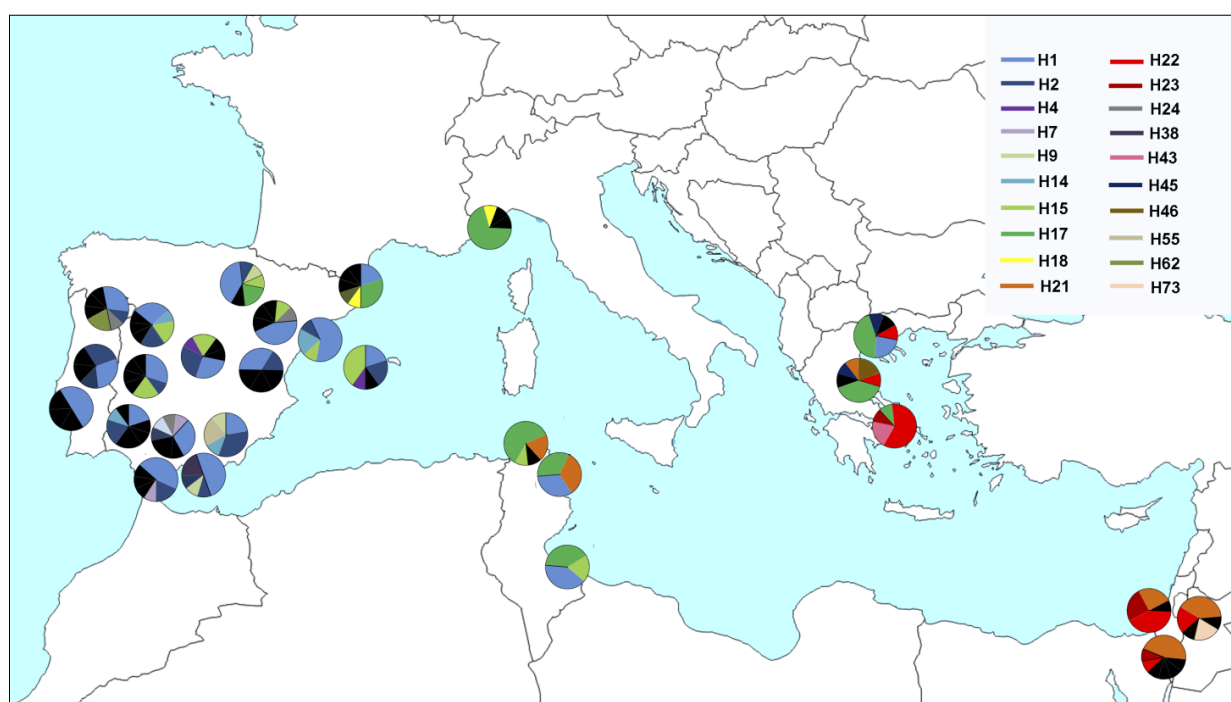


Figura 4F. Representación de las frecuencias de los haplotipos de la secuencia de 1151 pb del gen COI en las poblaciones de mosca del olivo estudiadas.

	MAL	MAD	NAV	SAL1	TAR	BAD	BAL	CAC	COR	GER	GRA	JAE	SAL2	TER	VAL	POR1	POR2	ITA	TUN1	TUN2	TUN3	GRE1	GRE2	GRE3	ISR1	ISR2
MAD	0,000																									
NAV	0,006	0,000																								
SAL1	0,004	0,026	0,072																							
TAR	0,000	0,000	0,028	0,030																						
BAD	0,010	0,027	0,063	0,006	0,005																					
BAL	0,021	0,000	0,000	0,101	0,037	0,096																				
CAC	0,000	0,000	0,000	0,012	0,000	0,004	0,000																			
COR	0,000	0,002	0,004	0,019	0,000	0,036	0,034	0,000																		
GER	0,019	0,028	0,000	0,063	0,050	0,039	0,061	0,000	0,005																	
GRA	0,018	0,000	0,046	0,074	0,000	0,045	0,000	0,000	0,060	0,091																
JAE	0,000	0,000	0,023	0,035	0,000	0,015	0,042	0,000	0,000	0,051	0,000															
SAL2	0,016	0,000	0,000	0,071	0,010	0,066	0,000	0,000	0,000	0,006	0,032	0,001														
TER	0,009	0,019	0,000	0,048	0,046	0,060	0,042	0,000	0,000	0,000	0,100	0,048	0,000													
VAL	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,015	0,051	0,000	0,000	0,000	0,063	0,006	0,000	0,000												
POR1	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000											
POR2	0,013	0,022	0,000	0,047	0,050	0,041	0,079	0,011	0,000	0,000	0,116	0,051	0,018	0,000	0,000	0,044										
ITA	0,345	0,339	0,220	0,338	0,386	0,258	0,381	0,268	0,290	0,107	0,366	0,329	0,245	0,215	0,186	0,322	0,146									
TUN1	0,337	0,320	0,232	0,337	0,366	0,276	0,350	0,261	0,297	0,158	0,345	0,325	0,250	0,243	0,199	0,312	0,178	0,039								
TUN2	0,257	0,241	0,185	0,260	0,280	0,222	0,284	0,199	0,227	0,136	0,284	0,253	0,202	0,190	0,133	0,249	0,126	0,121	0,000							
TUN3	0,135	0,116	0,000	0,181	0,176	0,144	0,122	0,059	0,088	0,000	0,178	0,145	0,029	0,016	0,015	0,092	0,014	0,127	0,158	0,148						
GRE1	0,390	0,375	0,307	0,383	0,417	0,328	0,412	0,321	0,352	0,237	0,398	0,377	0,315	0,313	0,256	0,372	0,243	0,126	0,000	0,000	0,250					
GRE2	0,282	0,274	0,185	0,282	0,318	0,230	0,319	0,209	0,236	0,107	0,315	0,280	0,212	0,190	0,136	0,274	0,115	0,036	0,000	0,000	0,114	0,000				
GRE3	0,717	0,700	0,696	0,697	0,745	0,646	0,729	0,663	0,675	0,643	0,695	0,692	0,650	0,671	0,625	0,689	0,603	0,650	0,424	0,278	0,711	0,338	0,435			
ISR1	0,735	0,719	0,718	0,716	0,754	0,672	0,743	0,689	0,696	0,675	0,712	0,709	0,676	0,695	0,659	0,710	0,640	0,684	0,477	0,318	0,732	0,407	0,504	0,093		
ISR2	0,783	0,766	0,768	0,760	0,807	0,713	0,791	0,735	0,741	0,720	0,756	0,756	0,719	0,741	0,704	0,754	0,681	0,736	0,525	0,359	0,789	0,455	0,556	0,075	0,000	
ISR3	0,732	0,716	0,716	0,714	0,752	0,671	0,740	0,687	0,696	0,673	0,711	0,709	0,675	0,694	0,658	0,708	0,641	0,682	0,473	0,307	0,729	0,410	0,509	0,169	0,000	0,002

Tabla 5F. Índices de fijación F_{ST} entre las 27 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas en la cuenca mediterránea. En negrita figuran los valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) tras aplicar las correcciones de Bonferroni

Para analizar la estructura genética que despliegan las poblaciones de la mosca del olivo en la cuenca mediterránea, se calcularon, en primer lugar, los índices de fijación F_{ST} (Slatkin *et al.* 1995) entre las 27 poblaciones muestreadas (Tabla 5F). Estas estimas resultaron prácticamente nulas al comparar las poblaciones de mosca del olivo de España y el valor más alto de F_{ST} fue de 0.101, al confrontar las poblaciones de Salamanca 1 (SAL1) y Baleares (BAL). Estos valores tan bajos apuntan a una ausencia de diferenciación genética entre las poblaciones de nuestro país ocurriendo lo mismo al comparar las poblaciones de España (entre las que se incluye la población de Baleares) con las de Portugal, por lo que las 17 poblaciones españolas y portuguesas de *B. oleae* constituirían una única metapoblación. También se evidenció ausencia de diferenciación genética entre las poblaciones de *B. oleae* de Israel ($0 - 0.002$) y reducida entre las de Túnez ($0 - 0.158$), si bien con cierta diferenciación de la población de TUN3 de las otras dos de dicho país. Al observar las poblaciones de Grecia, GRE1 y GRE2 no mostraron diferenciación genética (GRE1-GRE2 F_{ST} : 0). En cambio, GRE3 arrojó unos valores de F_{ST} de 0.338 y 0.435 con las anteriores, por lo que las poblaciones griegas no resultaron homogéneas.

En general, los valores de F_{ST} obtenidos al comparar dos a dos las poblaciones de España y Portugal con las de Italia y Túnez fueron bajos, oscilando entre 0.039 (ITA-TUN1) y 0.256 (entre el conjunto de poblaciones de la Península Ibérica e Italia). Las poblaciones de Grecia GRE1 y GRE2 reflejaron una mayor proximidad genética a las poblaciones de Italia (F_{ST} : 0.039 - 0.126) y Túnez (F_{ST} : 0 - 0.25). Por el contrario, la tercera población de Grecia, GRE3, reflejó ser genéticamente más parecida a las poblaciones de Israel (F_{ST} : 0.075 - 0.169).

A partir de la matriz de los índices de fijación F_{ST} se realizó un análisis de coordenadas principales, visualizando de un modo gráfico las relaciones que se establecen entre las poblaciones de mosca del olivo estudiadas (Figura 5F). En una gráfica de dos dimensiones quedó recogido el 100% de la varianza genética. El eje de abscisas absorbió el 97% de la misma y separó dos grupos de poblaciones de mosca del olivo en el Mediterráneo (líneas continuas en la Figura 5F). El primer grupo englobaría las tres poblaciones de mosca del olivo de Israel (ISR1, ISR2 e ISR3) y una de Grecia, GRE3. El segundo grupo estaría constituido por las 18 poblaciones españolas y lusas, las tres tunecinas, la población italiana y las poblaciones de Grecia GRE1 y GRE2. Hay que señalar una notable subestructura en las poblaciones de mosca del olivo de este segundo grupo (líneas discontinuas). Por un lado, las españolas y las portuguesas agrupan juntas, como una metapoblación. Por otro, se observa la proximidad genética entre dos poblaciones de Túnez (TUN1 y TUN2) y de Grecia (GRE1 y GRE2). El eje de ordenadas solo absorbió un 2.99 % de la variación genética pero refleja la diferenciación de la

población de *B. oleae* en Italia, que ocupa una posición intermedia entre los subgrupos descritos en el segundo grupo genético de *Bactrocera oleae* observado en el Mediterráneo.

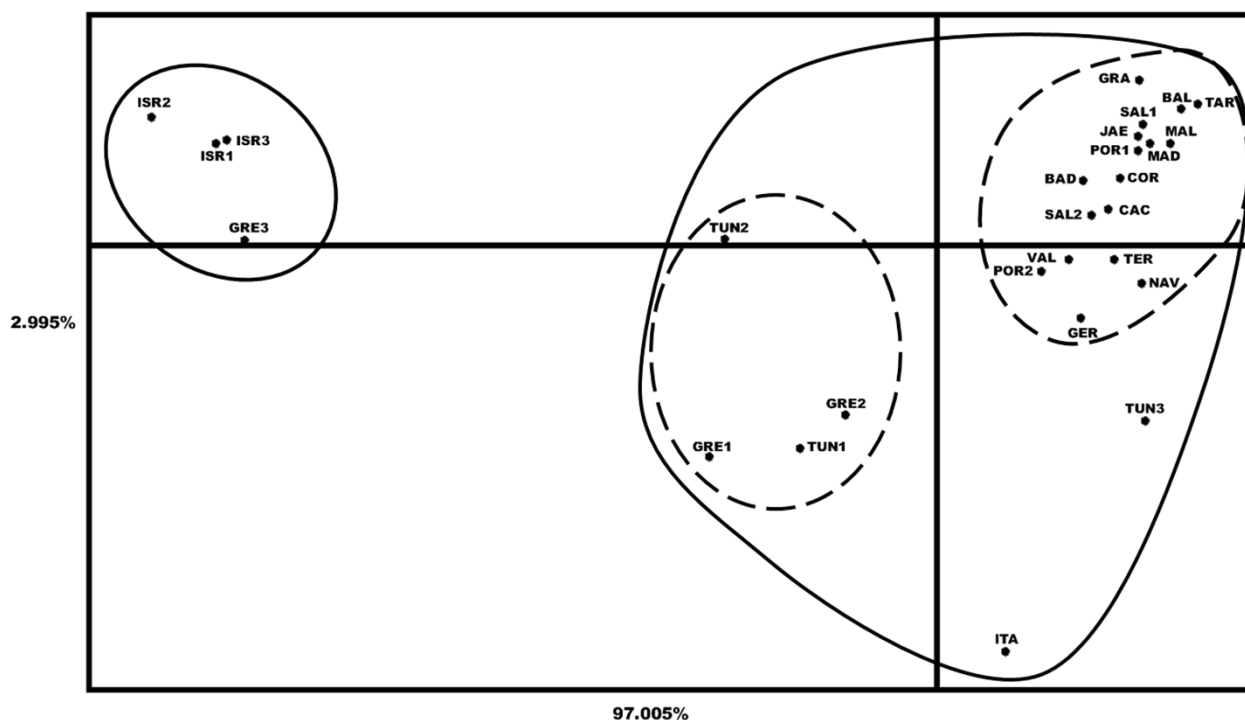


Figura 5F. Análisis de coordenadas principales de las 27 poblaciones de *Bactrocera oleae* analizadas elaborado a partir de los índices F_{ST} .

El Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) en el conjunto de las 27 poblaciones del Mediterráneo reveló que un 58.62% de la varianza genética total es atribuible a las diferencias entre los individuos de una misma población y estadísticamente significativa (Tabla 6F). Considerando el marcado patrón de distribución geográfico de los haplotipos observado en el Mediterráneo (Figura 4F) y la diferenciación revelada en los anteriores análisis (Tabla 5F y Figura 5F), se efectuaron varios Análisis Moleculares de la Varianza estableciendo diferentes grupos de poblaciones de *B. oleae*.

Al realizar un AMOVA con las poblaciones de España y Portugal, se observa que la mayor parte de la varianza (98.7%) se debe a diferencias entre individuos de una misma población y no entre poblaciones, confirmando los resultados de los análisis F_{ST} . Resultados similares se obtienen en los AMOVA entre las poblaciones de *B. oleae* de Israel o de Túnez, donde el 100% de la varianza genética y el 90.52% respectivamente, son atribuibles a las diferencias entre los individuos de la misma población. Por el contrario, en el AMOVA con las poblaciones de Grecia (GRE1, GRE2 y GRE3) las tres cuartas partes de la varianza genética eran atribuibles a las diferencias entre los individuos de la muestra ($p < 0.001$) corroborando la

heterogeneidad genética de estas poblaciones, tal y como reflejaron los índices F_{ST} .

	Grados de libertad	Componente de la varianza	% de variación	Valor de p
AMOVA				
1 Grupo: Todas las poblaciones mediterráneas				
Entre poblaciones	26	0.625	41.38	< 0.001
Entre individuos de la misma pobl.	231	0.886	58.62	
1 Grupo: Poblaciones de España y Portugal				
Entre poblaciones	16	0.011	1.31	> 0.05
Entre individuos de la misma pobl.	143	0.870	98.69	
1 Grupo: Poblaciones Túnez 1, 2 y 3				
Entre poblaciones	2	0.103	9.48	> 0.05
Entre individuos de la misma pobl	23	0.986	90.52	
1 Grupo: Poblaciones Israel 1, 2 y 3				
Entre poblaciones	2	0	0	> 0.05
Entre individuos de la misma pobl.	30	0.806	100	
1 Grupo: Poblaciones Grecia 1, 2 y 3				
Entre poblaciones	2	0.395	27.23	< 0.001
Entre individuos de la misma pobl.	26	1.057	72.77	
1 Grupo: Poblaciones del grupo Oeste				
Entre poblaciones	3	0.301	24.68	< 0.001
Entre individuos de la misma pobl.	211	0.920	75.32	
2 Grupos: Este (GRE3 e ISR) / Oeste (P. Ibérica, Italia, Túnez, Grecia 1 y 2)				
Entre Grupos	1	1.705	62.59	< 0.001
Entre poblaciones del mismo grupo	25	0.133	4.89	< 0.001
Entre individuos de la misma pobl.	231	0.886	32.52	< 0.001

Tabla 6F. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA). Pobl: Población.

A continuación, se realizó un Análisis Espacial Molecular de la Varianza (SAMOVA) para inferir el número más probable de grupos genéticos de mosca del olivo en la cuenca mediterránea y las poblaciones que pertenecerían a cada uno de ellos (Figura 6F). Los resultados, estadísticamente significativos, apoyan los análisis anteriores, indicando la existencia de dos grupos genéticos en la región Mediterránea (F_{CT} : 0.625, $p < 0.001$). Como puede observarse en la Figura 6F, un grupo está formado por las poblaciones de la Península Ibérica, Baleares, Italia, Túnez, Grecia 1 y Grecia 2 (en azul) y el segundo grupo genético por las poblaciones de mosca del olivo procedentes de Israel y Grecia 3 (en rojo).



Figura 6F. Resultado del SAMOVA con los grupos genéticos más probables dentro de las poblaciones de *B. oleae* en el Mediterráneo

De este modo, al efectuar un AMOVA con estos dos grupos genéticos inferidos por SAMOVA se maximiza la varianza genética debida a las diferencias entre los dos grupos, un 62.6% (Tabla 6F).

El último análisis de AMOVA se llevó a cabo sólo con la información genética de las poblaciones englobadas en el grupo *Oeste*; los resultados de este análisis muestran que, aunque la mayor parte de la varianza total se encuentra dentro de las poblaciones (75.32%, $P < 0.001$), un cuarto de la varianza genética 24.68% ($P < 0.001$) se debe a las diferencias en los patrones de diversidad genética encontradas entre las poblaciones de *B. oleae* de esos países.

Por tanto, los resultados de los cálculos de F_{ST} , de AMOVA, SAMOVA y de componentes principales ponen de manifiesto la existencia de dos grupos genéticos en las poblaciones de *Bactrocera oleae* en la cuenca mediterránea. Un primer grupo al que hemos denominado *Oeste*, que englobaría las poblaciones españolas, portuguesas, tunecinas, la población de Italia y las de Grecia, GRE 1 y GRE 2. A su vez, este grupo exhibe cierta subestructura, agrupando las poblaciones de España y Portugal por un lado, las poblaciones de Túnez (TUN 1 y TUN 2) y Grecia (GRE1 y GRE 2) por otro, con las poblaciones procedentes de Italia (ITA) y Túnez (TUN3) entre ambos subgrupos. El segundo grupo genético lo constituirían las poblaciones de mosca del olivo de Israel y la de Grecia GRE 3 y se ha nombrado como grupo *Este*.

Por último, las estimas de flujo genético realizadas a partir de los valores de F_{ST} se recogen en la Tabla 7F. Puesto que las poblaciones de España y Portugal exhibieron escasa diferenciación genética, se unieron en una sola población llamada Península Ibérica (PI). Se ha procedido de igual forma con las tres poblaciones de Túnez y con las poblaciones de Grecia, GRE1 y GRE2, genéticamente muy similares y renombradas GRE. El valor de flujo génico en el conjunto de poblaciones que conforman el grupo *Oeste* fue 3.14 (F_{ST} promedio 0.137). Dentro del grupo *Oeste*, los valores de Nm (valores sombreados en gris claro) resultaron ilimitados, en la práctica, cuando se estimaron entre las poblaciones de Túnez, Grecia e Italia. En cambio, fueron menores entre la Península Ibérica y el resto de las poblaciones del grupo *Oeste*, a excepción del calculado con las poblaciones de Túnez (Nm : 2.08). En cuanto al grupo *Este*, el flujo genético entre las poblaciones de Israel y Grecia 3 (valor sombreado en gris oscuro) fue Nm : 3.51 (F_{ST} : 0.118).

Finalmente, el flujo genético promedio estimado entre las poblaciones del grupo *Este* y las del grupo *Oeste* del Mediterráneo fue muy reducido (resaltados en gris medio), Nm : 0.27 (F_{ST} : 0.649).

	PI	ITA	TUN	GRE	GRE3
ITA	1.27				
TUN	2.08	8.32			
GRE	1.1	4.34	∞		
GRE3	0.24	0.46	0.50	0.77	
ISR	0.20	0.21	0.38	0.53	3.51

Tabla 7F. Valores de Nm (flujo genético) obtenidos a partir de las estimas de F_{ST} calculadas entre los grupos de poblaciones de mosca del olivo del Mediterráneo.

Relaciones filogenéticas

La red de haplotipos generada por el método de unión de medianas permitió establecer las relaciones entre los 73 haplotipos detectados y los pasos mutacionales que los separan (Figura 7F). Los haplotipos están representados por diagramas de sectores con un tamaño proporcional al número de individuos que lo portan. Para facilitar la comprensión de la imagen y teniendo en cuenta el elevado número de poblaciones analizadas, cada color representa un país.

La red exhibe una topología estrellada, de tres de los haplotipos mayoritarios (H1, H17 y H22) radian los demás haplotipos detectados. El haplotipo H1 es el más frecuente y está presente en poblaciones de España, Portugal, Túnez y Grecia; de él derivan numerosos haplotipos exclusivos separados por un solo paso mutacional y que sólo están presentes en las poblaciones de la Península Ibérica. El segundo haplotipo mayoritario de la muestra es H17, que dista de H1 en un único cambio de base. Este haplotipo es el que tiene una distribución geográfica más amplia; se ha identificado en las poblaciones mosca del olivo de Italia, Grecia, Túnez y en menor frecuencia en las poblaciones de España, y la red lo designa como el haplotipo ancestral. De este haplotipo H17 derivan numerosos haplotipos a bajas frecuencias encontrados en las poblaciones de Grecia (GRE 1 y GRE 2), Italia, Túnez y España. Los haplotipos H1 y H17 junto con los 57 haplotipos que derivan de ellos, constituirían el grupo genético que hemos denominado *Oeste*.

El haplotipo H22 es el tercer haplotipo de mayor frecuencia en el Mediterráneo, y representativo de las poblaciones de Grecia e Israel; difiere de H1 y H17 en 4 y 3 SNP respectivamente. El haplotipo H21, presente en poblaciones de Grecia, Israel y Túnez queda separado por dos pasos mutacionales de H22. Estos dos haplotipos, H21 y H22, junto a siete haplotipos exclusivos identificados en las poblaciones de Israel y 4 presentes en baja frecuencia en Grecia e Israel, constituyen el grupo genético *Este*.

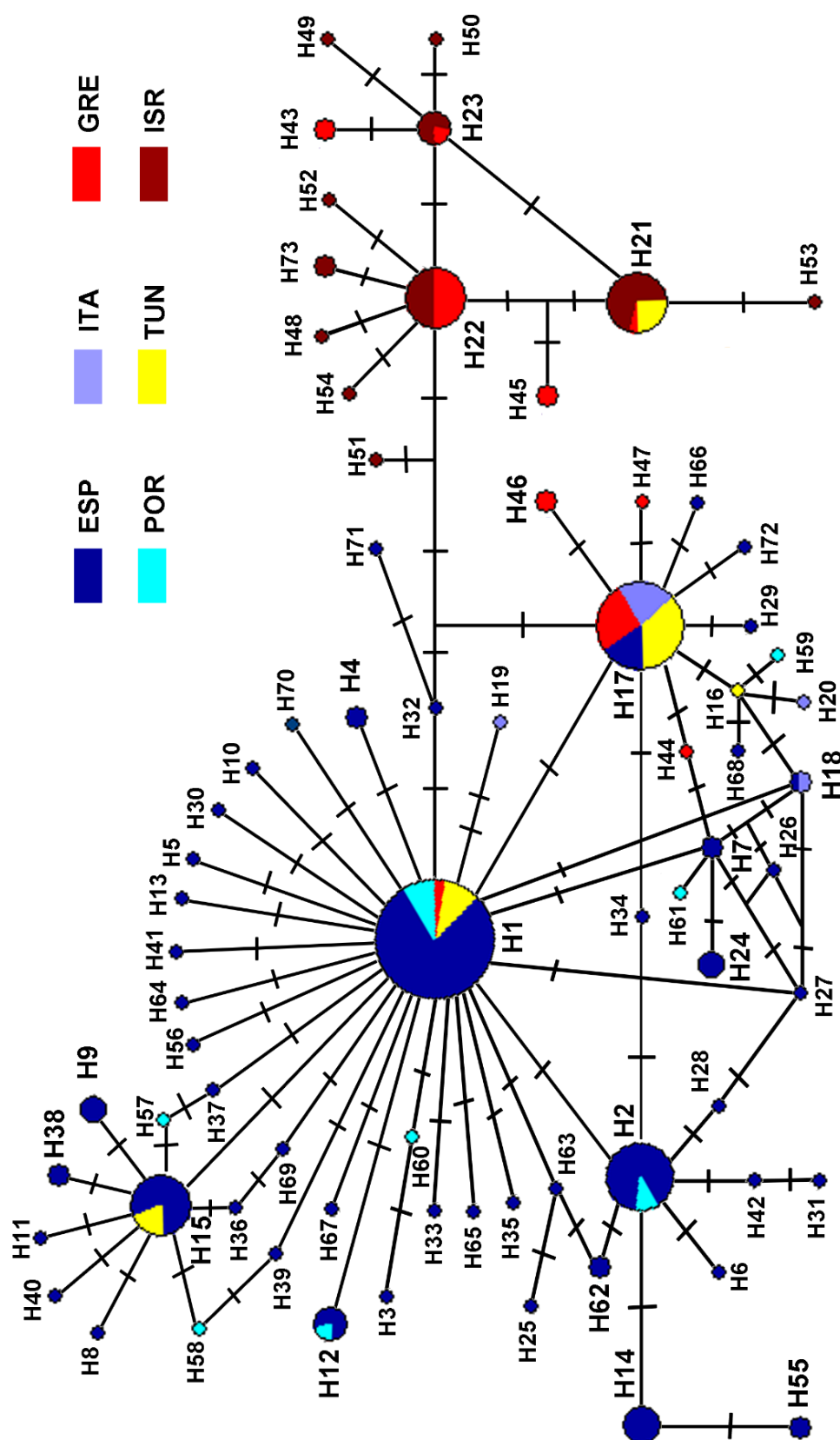


Figura 7F. Red de los 73 haplotipos detectados en las poblaciones de *B. oleae* analizadas. Por colores se identifican los países. Las barras indican los pasos mutacionales que separan los distintos haplotipos. Las intersecciones representan haplotipos no muestreados. H17 es el designado como el ancestral.

Con la idea de tener una perspectiva más completa de la estructura genética de la especie estudiada en el Mediterráneo, se elaboró una segunda red de haplotipos incluyendo otras 31 secuencias de COI de *Bactrocera oleae* procedentes de los trabajos de Nardi *et al.* (2005), Frey *et al.* (2013), excluyendo los identificados en un único individuo. La Figura 8F muestra la red obtenida, similar a la de la Figura 7F, donde los diagramas de sectores identifican con colores el país de procedencia de cada individuo. En esta red se aprecia que se mantiene el patrón de distribución geográfico de la variabilidad genética que hemos detectado en nuestro trabajo. Las secuencias de moscas procedentes de Argelia (H2), Italia (H1 y H17), Marruecos (H74) y Grecia (H2 y H17) se englobaron dentro del grupo *Oeste* del Mediterráneo. Las secuencias de moscas de Turquía e Israel, se incluyeron en H21, H2, H23, H52 y H54, haplotipos del grupo *Este*. Cabe destacar que las secuencias procedentes de California (EEUU), se englobaron dentro del haplotipo H22 característico del haplogrupo *Este*.

Finalmente, y separado del haplotipo H17 por un único salto mutacional, se encuentra el haplotipo H76, que presentan las moscas de Kenia (KEN) y Sudáfrica (SAF). A su vez, H76 se relaciona con los haplotipos H77, H78 y H79, separados por cuatro o cinco cambios de base, los cuales definirían un nuevo haplogrupo formado por secuencias de moscas procedentes de Pakistán.

Para enraizar la red, se ha incluido una secuencia de *Bactrocera dorsalis*, una especie del mismo género de tefrítidos. Esta especie fuera de grupo, permite establecer que los haplotipos de las moscas de Pakistán y del sur de África serían los ancestrales y confirmar que en nuestro estudio filogeográfico el haplotipo H17 sería el ancestral de los 73 haplotipos detectados en la cuenca mediterránea.

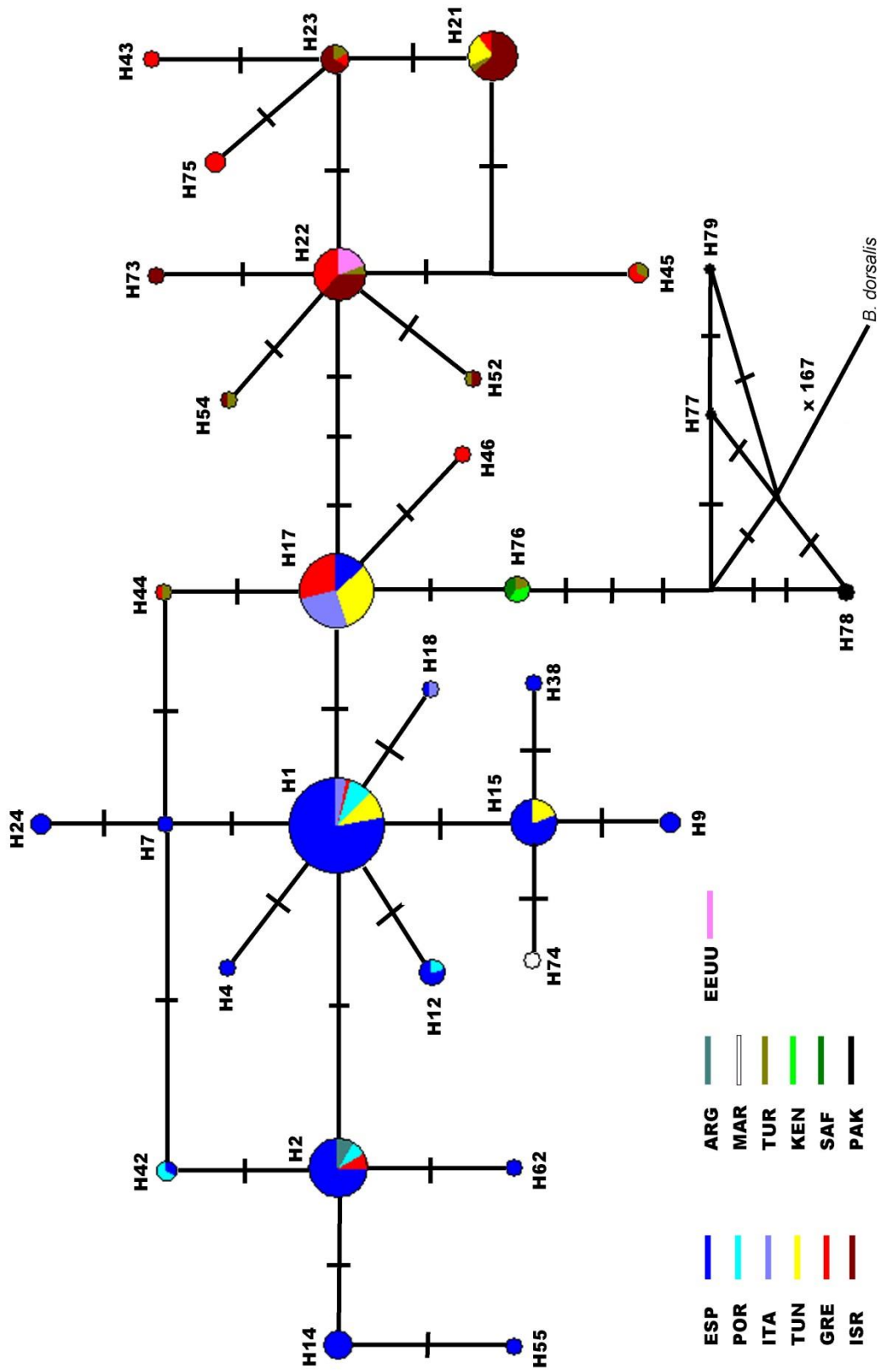


Figura 8F. Red de haplotipos generada con secuencias del gen COI de especímenes de *B. oleae* de 4 continentes. Por colores se identifican los países. Las barras indican los pasos mutacionales que separan los distintos haplotipos. Las intersecciones representan haplotipos no muestreados. Como elemento fuera de grupo se ha incluido una secuencia de *B. dorsalis*.

El análisis de las relaciones filogenéticas entre los haplotipos identificados en las poblaciones de la mosca del olivo en el Mediterráneo también se abordó mediante tres métodos filogenéticos clásicos: el vecino más próximo (NJ), Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB) excluyendo los haplotipos exclusivos. Las tres aproximaciones revelaron árboles de topología parecida (Figura 9F). Tanto el NJ como BI separan en dos grandes ramas los haplotipos de los dos grupos de poblaciones identificados en la cuenca del Mediterráneo, Este y Oeste. Por otra parte, el árbol construido mediante MP separa en una rama los haplotipos del Este y en otra haplotipos de la Península Ibérica, quedando en las posiciones más basales el resto de haplotipos mediterráneos.

Tanto el árbol generado por el método del NJ como el de MP y el de IB separan los haplotipos H21, H22, H23, H43, H45 y H73 del grupo Este con unos valores intermedios de *Bootstrap*. Si bien el árbol generado por IB carece de soporte estadístico. La mayoría de estos haplotipos del grupo Este se diferencian en una única mutación, quedando el H73, característico de Israel, en la posición más basal.

Por otro lado, se agruparon los haplotipos del grupo Oeste. En las tres reconstrucciones se puede observar como el haplotipo H17, designado como ancestral, queda en las posiciones más basales dentro de esta rama. Así mismo, se puede apreciar como en las tres reconstrucciones una de las ramas del grupo Oeste agrupa a los haplotipos H2, H14, H55 y H62, característicos de la Península Ibérica y Túnez, apoyado por un valor de *Bootstrap* bajo en el de MP.

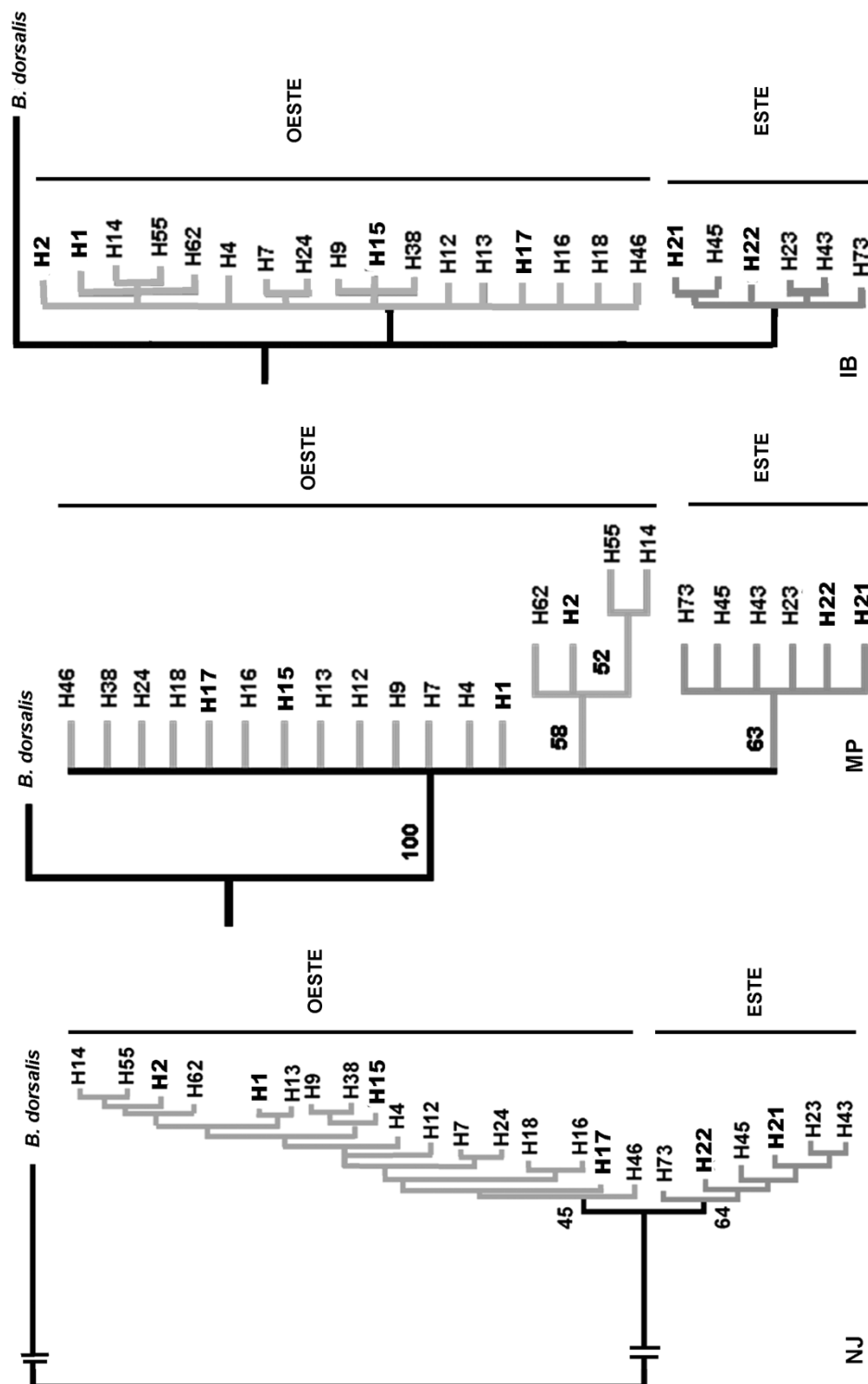


Figura 9F. Árboles de haplotipos obtenidos por los métodos de reconstrucción filogenética del vecino más próximo (NJ), Máxima parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB), donde no se muestran las probabilidades posteriores por ser inferiores a 0.5.

Inferencias demográficas.

Se realizaron inferencias demográficas de las poblaciones de la mosca del olivo en el Mediterráneo a partir de los resultados de los test de neutralismo Tajima D, R_2 , y F_s de Fu, basados en datos de polimorfismo intraespecífico y de las distribuciones de las frecuencias de las diferencias por pares de secuencias o de *mismatch*.

En el conjunto de poblaciones de la Península ibérica los valores D- Tajima y F_s de Fu fueron negativos, R_2 fue muy bajo, y estadísticamente significativos o próximos a la significación. Estos valores negativos reflejaron una desviación de la neutralidad consecuencia de un exceso de polimorfismos a bajas frecuencias, indicando una expansión demográfica (Tabla 8F). Igualmente, la distribución *mismatch* unimodal a la izquierda (Figura 10F), se ajustó a un modelo de expansión repentina ($SSD= 0.0022$, $p > 0.05$). Se calculó el valor de Tau, que permite estimar el tiempo transcurrido desde la última expansión expresado en unidades de tiempo mutacional. A partir de Tau y considerando un tiempo de generación de 0.25 años, se estimó que esta expansión en la Península Ibérica pudo ocurrir hace unos 66,000 años.

Cuando se analizan estos parámetros en el grupo Oeste (PI, Túnez, Italia, Grecia 1 y Grecia 2), se obtuvieron unos valores negativos para los parámetros D-Tajima y F_s y un valor de R_2 muy bajo que resultaron estadísticamente significativos o muy próximos a la significación. La gráfica de la distribución *mismatch* fue unimodal a la izquierda y se ajustó a un modelo de expansión repentina ($SSD= 0.00273$, $p > 0.0589$) (Figura 10F). El tiempo transcurrido desde la última expansión, estimado a partir del valor de Tau, fue de unos 48,700 años.

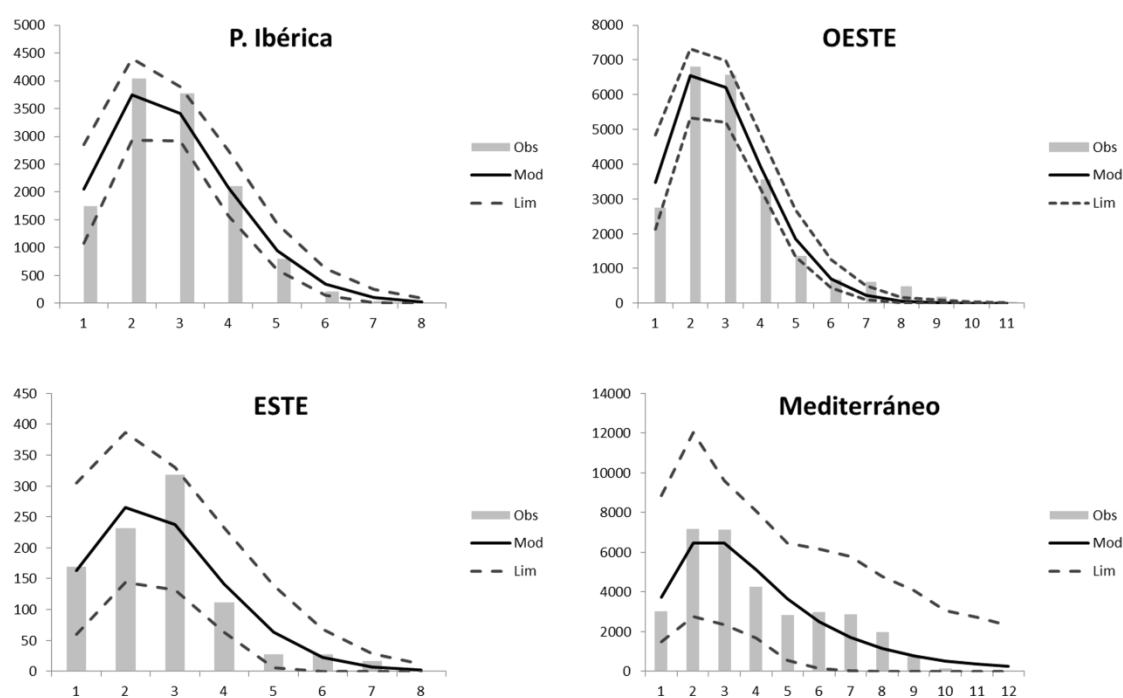
El grupo Este (Israel y Grecia 3), también reflejó desviación de la neutralidad por sus valores negativos de D-Tajima y F_s de Fu, ambos estadísticamente significativos. Como en los casos anteriores, la gráfica *mismatch* fue unimodal a la izquierda y se ajustó a un modelo de expansión poblacional espacial ($SSD=0.0142$, $p=0.058$) (Figura 10F) donde la estima del tiempo transcurrido desde esta última expansión, a partir del valor de Tau, fue de 61,500 años.

De nuevo, las inferencias demográficas en el conjunto de las poblaciones mediterráneas de *B. oleae* volvieron a reflejar una desviación de la neutralidad y las mismas tendencias que en los anteriores análisis. La distribución de las frecuencias de las diferencias por pares de secuencias se ajustó a un modelo de expansión poblacional espacial ($SSD= 0.0048$ $p>0.392$) (Figura 10F) y el tiempo estimado desde la última expansión, hace unos 61,000 años.

En definitiva, estos resultados apuntan una expansión de las poblaciones de *Bactrocera oleae* en el Mediterráneo tras un cuello de botella, fechándola en el Pleistoceno.

	D-Tajima	p	R ₂	p	F _s	p	TAU	tiempo
P. Ibérica	-2.396	<0.01	0.084	<0.001	-0.332	>0.05	1.763	66,600
OESTE	-2.331	<0.01	0.081	<0.001	-0.152	>0.05	1.290	48,700
ESTE	-1.408	>0.01	0.115	<0.05	-0.041	>0.05	1.630	61,500
Mediterráneo	-2.052	<0.05	0.078	<0.01	-0.493	<0.05	1.627	61,000

Tabla 8F. Valores de los test de neutralismo; valores de significación estadística (p); TAU, tiempo transcurrido desde la última expansión en unidades de tiempo mutacional; años transcurridos desde la última expansión calculados la tasa de mutación del 2.3% del COI de insectos.



Figura

Figura 10F. Distribuciones *mismatch* observadas (barras) y esperadas (línea continua en negro, con los límites de confianza asociados mostrados como líneas discontinuas) en el conjunto de poblaciones del Mediterráneo (ajuste al modelo de expansión espacial), la Península Ibérica (modelo de expansión repentina) y los dos grupos genéticos designados como Oeste (modelo de expansión repentina) y Este (modelo de expansión espacial) del Mediterráneo.

Análisis de los marcadores ISSR

Se ha analizado un total de 36 bandas ISSR en las poblaciones de *Bactrocera oleae* en el Mediterráneo generadas con los 5 cebadores empleados. Las Figuras 11F y 12F muestran los perfiles de ISSR obtenidos en las distintas poblaciones al amplificar el DNA de *B. oleae* con varios de los cebadores utilizados en este estudio. Como se puede observar, el patrón de bandas es característico de cada cebador. El tamaño de las bandas analizadas osciló entre las 300 y las 1,200 pares de bases.

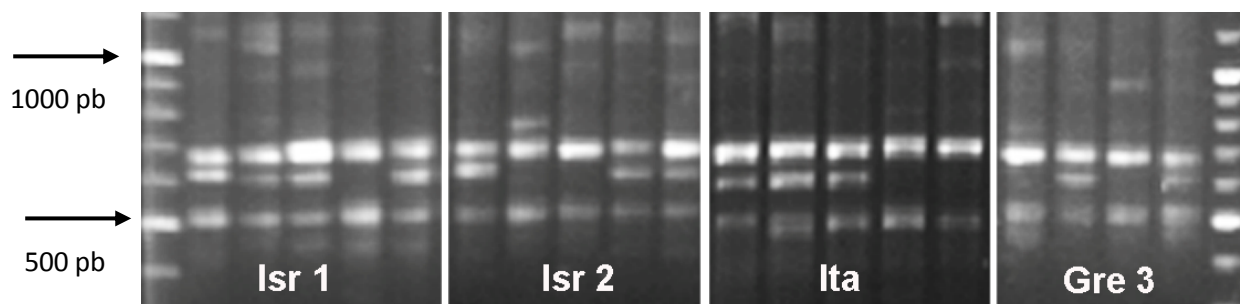


Figura 11F. Patrón de bandas obtenido al amplificar con el cebador 830 el DNA de moscas de *B. oleae* en las poblaciones Israel 1 (ISR1), Israel 2 (ISR2), Italia (ITA) y Grecia 3 (GRE3).

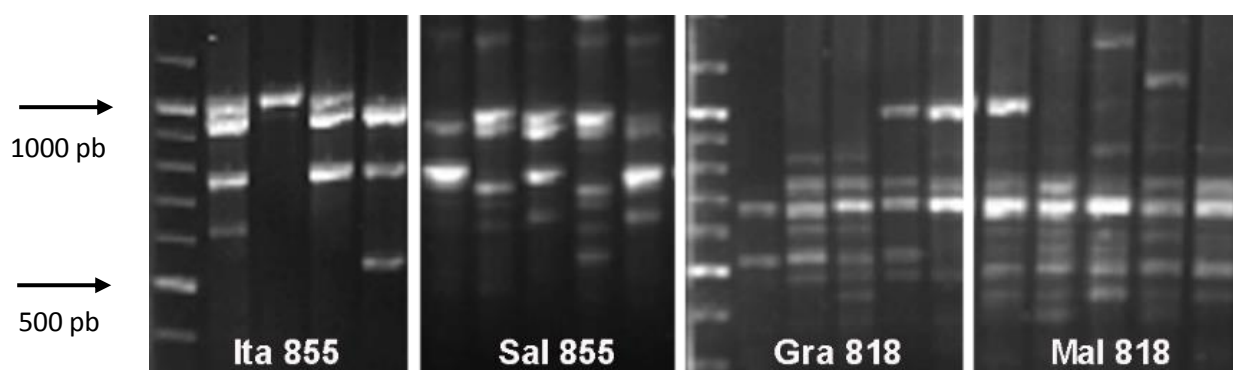


Figura 12F. Izquierda: Patrón de bandas obtenido al amplificar con el cebador 855 el DNA de moscas de *B. oleae* de Italia (ITA) y Salamanca (SAL). Derecha: patrón de bandas obtenido al amplificar con el cebador 818 el DNA de moscas de *B. oleae* de Granada (GRA) y Málaga (MAL).

A partir de las lecturas de los perfiles de ISSR obtenidos con cada cebador, se estimaron el número de loci monomórficos, los loci polimórficos y el porcentaje de los mismos en las 16 poblaciones de mosca del olivo del mediterráneo (Tabla 9F). El cebador 830 presentó una mayor proporción de loci monomórficos, destacando la población de Madrid (MAD) con 4 de los 7 encontrados. Por el contrario, los cebadores 855 y 817 presentaron un mayor polimorfismo. El número de loci polimórficos varió entre 24 (población de Grecia 3, GRE3) y 33 (Jaén, JAE). En general, todas las poblaciones mostraron un porcentaje de polimorfismo

elevado, oscilando entre el 66 % y el 91%, en concordancia con los niveles de variabilidad genética detectados al analizar la secuencia del gen COI en las poblaciones.

POB	817		818		830		855		851		LP	P
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T		
BAR	0	7	2	8	1	7	0	8	1	6	32	0.88
GRA	0	7	2	8	1	7	1	8	1	6	31	0.86
JAE	0	7	1	8	2	7	0	8	0	6	33	0.91
MAD	3	7	3	8	4	7	0	8	1	6	25	0.69
MAL	0	7	3	8	2	7	1	8	3	6	27	0.75
NAV	0	7	0	8	3	7	1	8	1	6	31	0.86
SAL1	1	7	2	8	3	7	0	8	1	6	28	0.77
SAL2	2	7	1	8	3	7	1	8	1	6	28	0.77
POR2	2	7	4	8	2	7	0	8	0	6	28	0.77
ITA	0	7	0	8	2	7	3	8	1	6	30	0.83
TUN2	2	7	1	8	2	7	2	8	2	6	27	0.75
TUN3	0	7	3	8	3	7	1	8	0	6	29	0.80
GRE2	2	7	3	8	2	7	3	8	1	6	25	0.69
GRE3	2	7	2	8	3	7	4	8	1	6	24	0.66
ISR1	2	7	0	8	3	7	0	8	1	6	28	0.77
ISR2	3	7	1	8	1	7	0	8	2	6	29	0.80

Tabla 9F. Loci monomórficos (M) y total de loci observados (T) con cada cebador en cada población de mosca del olivo analizada. LP, Total de loci polimórficos. P: polimorfismo según el criterio del 95%.

POB	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>He</i>
BAR	1.888 ± 0.318	1.634 ± 0.369	0.348 ± 0.180	0.570 ± 0.240	0.343 ± 0.126
GRA	1.861 ± 0.350	1.487 ± 0.345	0.289 ± 0.174	0.437 ± 0.232	0.332 ± 0.133
JAE	1.916 ± 0.280	1.572 ± 0.357	0.325 ± 0.175	0.482 ± 0.231	0.323 ± 0.140
MAD	1.694 ± 0.467	1.399 ± 0.391	0.230 ± 0.203	0.346 ± 0.283	0.326 ± 0.151
MAL	1.750 ± 0.439	1.403 ± 0.373	0.238 ± 1.916	0.362 ± 0.266	0.271 ± 0.153
NAV	1.861 ± 0.350	1.551 ± 0.329	0.322 ± 0.163	0.478 ± 0.224	0.321 ± 0.143
SAL1	1.777 ± 0.421	1.460 ± 0.376	0.268 ± 0.192	0.401 ± 0.265	0.330 ± 0.145
SAL2	1.777 ± 0.421	1.406 ± 0.377	0.267 ± 0.193	0.400 ± 0.266	0.331 ± 0.142
POR2	1.777 ± 0.421	1.512 ± 0.373	0.295 ± 0.199	0.434 ± 0.271	0.349 ± 0.139
ITA	1.833 ± 0.378	1.566 ± 0.349	0.324 ± 0.176	0.476 ± 0.242	0.346 ± 0.132
TUN2	1.750 ± 0.392	1.510 ± 0.400	0.285 ± 0.207	0.416 ± 0.287	0.316 ± 0.141
TUN3	1.805 ± 0.401	1.483 ± 0.371	0.280 ± 0.190	0.418 ± 0.261	0.309 ± 0.134
GRE2	1.694 ± 0.467	1.444 ± 0.378	0.257 ± 0.199	0.381 ± 0.282	0.390 ± 0.142
GRE3	1.666 ± 0.478	1.443 ± 0.423	0.245 ± 0.219	0.358 ± 0.304	0.315 ± 0.147
ISR1	1.777 ± 0.421	1.512 ± 0.373	0.295 ± 0.199	0.430 ± 0.272	0.332 ± 0.161
ISR2	1.805 ± 0.401	1.483 ± 0.371	0.280 ± 0.190	0.387 ± 0.261	0.295 ± 0.148

Tabla 10F. Parámetros de variabilidad genética en las poblaciones de *B. oleae* analizadas. *Na*, número observado de alelos. *Ne*, número efectivo de alelos. *H*, diversidad genética de Nei. *I*, Índice de *Shannon*. *He*: Heterocigosis esperada.

En la Tabla 10F se recogen las estimas de variabilidad genética con el número observado y efectivo de alelos, la diversidad genética de Nei (1978), el índice de Shannon y la heterocigosis esperada (*He*). Los resultados obtenidos mostraron unos valores elevados en todas las poblaciones estudiadas, si bien, fueron más altos en las poblaciones de Jaén (JAE) y Barcelona (BAR) mientras que las poblaciones de Madrid (MAD) y Grecia (GRE2 y GRE3) reflejaron los más bajos.

Así mismo, se llevó a cabo un Análisis Molecular de la Varianza en el conjunto de las 16 poblaciones de mosca del olivo analizadas con este marcador (Tabla 11F). El porcentaje de la varianza genética atribuible a las diferencias entre las poblaciones fue próximo al 19% y estadísticamente significativo, siendo el 81% atribuible a las diferencias entre los individuos de la misma población.

Por otro lado, los resultados del AMOVA obtenidos al agrupar las poblaciones de *Bactrocera oleae* de acuerdo a los dos grupos genéticos *Este* y *Oeste* observados con el marcador mitocondrial determinaron, nuevamente, que la mayor parte de la variabilidad genética era atribuible a las diferencias entre los individuos de una misma población. Tan solo el 1.8% de esta varianza genética es consecuencia de las diferencias entre los grupos y el 18% debida a las diferencias entre las poblaciones de un mismo grupo, ambos datos son estadísticamente significativos.

AMOVA	Grados de libertad	Componente de la varianza	% de variación	Valor de p
1 Grupo: Todas las poblaciones mediterráneas				
Entre poblaciones	15	0.8966	18.93%	< 0.001
Entre individuos de la misma pobl.	706	3.8394	81.07%	
1 Grupo: Todas las poblaciones de la Península Ibérica.				
Entre poblaciones	2	0.8231	17.47%	< 0.001
Entre individuos de la misma pobl.	405	3.8896	82.53%	
2 Grupos: Este y Oeste				
Entre Grupos	1	0.0863	1.80%	<0.001
Entre poblaciones del mismo grupo	14	0.8632	18.02%	<0.001
Entre individuos de la misma pobl.	706	3.8394	80.17%	> 0.05

Tabla 11F. Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA). Pobl: Población.

Esta reducida diferenciación genética volvió a apreciarse en el valor de G_{ST} promedio entre todas las poblaciones mediterráneas, que fue de 0.166 y el flujo genético estimado a partir de este estadístico de diferenciación genética, de 2.509.

Para el estudio de la estructura de las poblaciones de la mosca del olivo en la cuenca del Mediterráneo también se calcularon las distancias genéticas de Nei (Tabla 12F). Los valores de estas distancias oscilaron entre 0.0283 (entre Navarra e Italia, NAV-ITA) y 0.1457 (entre Málaga y Grecia 2, MAL-GRE2). En general, las distancias obtenidas al comparar dos a dos las poblaciones de un mismo país resultaron más pequeñas en Túnez (TUN2-TUN3: 0.0355) mientras que entre las poblaciones de Israel (ISR1-ISR2: 0.0835), Grecia (GRE2-GRE3: 0.0684) y

España (Granada – Málaga, GRA-MAL: 0.1087) fueron más elevadas indicando que son poblaciones más heterogéneas, como se apreció en las estimas de diversidad genética. Estas distancias genéticas permiten apreciar una cierta tendencia en cuanto a la diferenciación de las poblaciones de la Península Ibérica con respecto a las de Grecia o Túnez.

A partir de la matriz de distancias de Nei se realizó un análisis de componentes principales que permitió visualizar de un modo gráfico las relaciones que se establecen entre los grupos de poblaciones estudiadas (Figura 13F). En una gráfica bidimensional quedó recogido el 60% de la variación genética. El eje de abscisas absorbió el 38 % de esta varianza discriminando parte de las poblaciones españolas y las dos tunecinas del resto del Mediterráneo. El eje de ordenadas absorbió el 22.21% de la variación genética y se observó cierta diferenciación de las poblaciones del grupo Este, diferenciando Grecia 2 (GRE2) e Israel (ISR1 e ISR2) de las demás poblaciones mediterráneas.

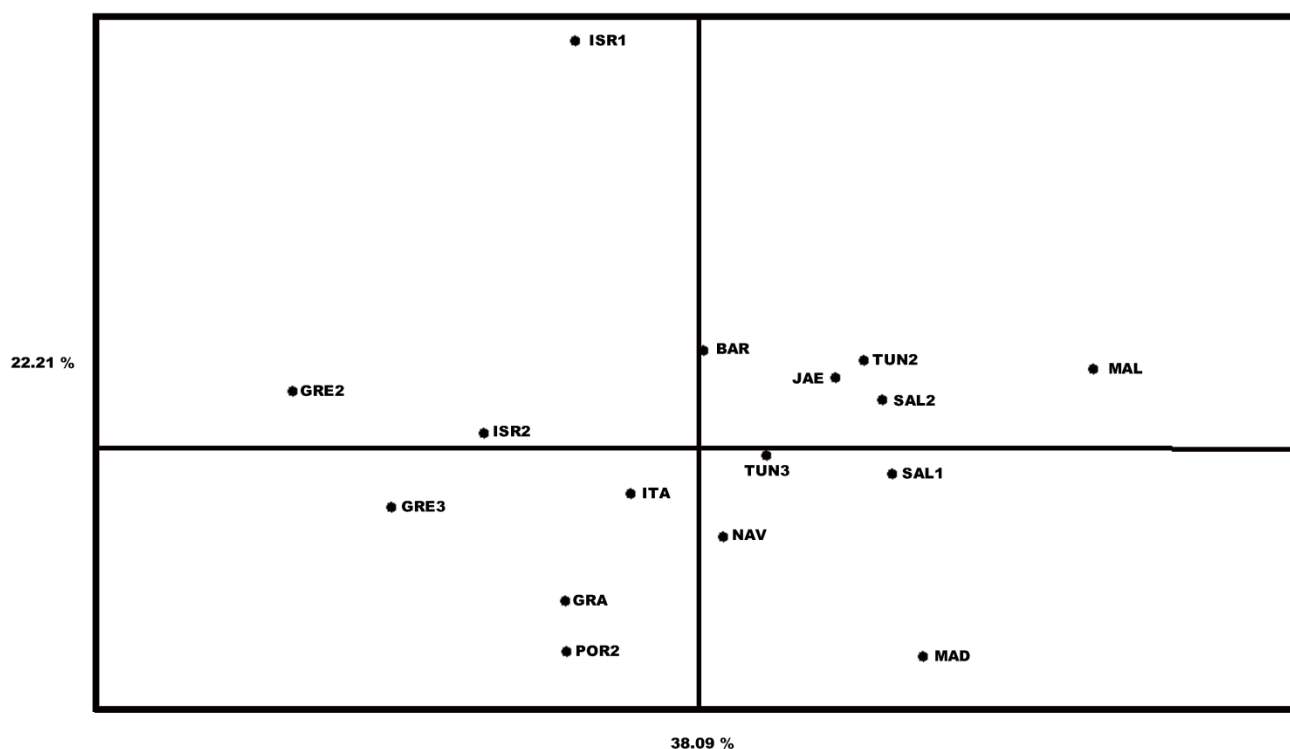


Figura 13F. Análisis de componentes principales de las 16 poblaciones de *Bactrocera oleae* elaborado a partir de las Dxy de Nei.

BAR	GRA	JAE	MAD	MAL	NAV	SAL1	SAL2	POR2	ITA	TUN2	TUN3	GRE2	GRE3	ISR1
GRA	0.0709													
JAE	0.0665	0.0717												
MAD	0.0962	0.0847	0.0819											
MAL	0.0917	0.1087	0.0423	0.0804										
NAV	0.0772	0.0517	0.0476	0.0543	0.0955									
SAL1	0.0711	0.0798	0.0541	0.0576	0.0826	0.0363								
SAL2	0.0791	0.0861	0.0787	0.1014	0.0947	0.0565	0.0357							
POR2	0.0910	0.0724	0.0702	0.0834	0.1018	0.0443	0.0731	0.0578						
ITA	0.0600	0.0409	0.0670	0.0570	0.0949	0.0283	0.0669	0.1159	0.0558					
TUN2	0.0997	0.1067	0.0955	0.0604	0.0882	0.0435	0.0415	0.0509	0.1016	0.0615				
TUN3	0.0852	0.0702	0.0602	0.0577	0.0499	0.0483	0.0443	0.0454	0.0580	0.0356	0.0355			
GRE2	0.0875	0.0799	0.1045	0.1142	0.1457	0.0875	0.1196	0.1172	0.0884	0.0617	0.1096	0.0684		
GRE3	0.0995	0.0688	0.1000	0.1061	0.1285	0.0698	0.0891	0.1073	0.0496	0.0595	0.0866	0.0603	0.0640	
ISR1	0.0901	0.1163	0.0799	0.1314	0.1104	0.0948	0.0990	0.1174	0.1181	0.0853	0.0810	0.0884	0.0867	0.0943
ISR2	0.0892	0.0520	0.0788	0.1139	0.1159	0.0594	0.0636	0.0721	0.0521	0.0586	0.0875	0.0678	0.0735	0.0834

Tabla 12F. Matriz de distancias de Nei entre las 16 poblaciones de la mosca del olivo analizadas en la cuenca del Mediterráneo.

Finalmente, a partir de la matriz de distancias genéticas de Nei se construyó un dendrograma con el método NJ (Figura 14F). Aunque en el árbol no se advierte una estructura clara, se puede apreciar una cierta tendencia de las poblaciones de mosca del olivo a agruparse, en algunos casos, con poblaciones geográficamente cercanas, si bien el soporte estadístico de las ramas fue reducido. Tal es el caso de Málaga (MAL) y Jaén (JAE), las dos poblaciones de Salamanca (SAL1 y SAL2) o las tunecinas (TUN2 y TUN3). Cabe destacar que la población de Israel ISR1 es la más diferenciada del resto. A continuación, se separan las poblaciones españolas de Málaga (MAL) y Jaén (JAE). Por último, el resto de poblaciones se bifurca en dos ramas. En una de ellas se englobaron las poblaciones de Grecia (GRE2 y GRE3), Israel (ISR2) e Italia (ITA) con algunas poblaciones ibéricas. En la segunda gran rama se incluyen las poblaciones de Túnez (TUN2 y TUN3) y las españolas de Salamanca (SAL1 y SAL2) y Madrid (MAD).

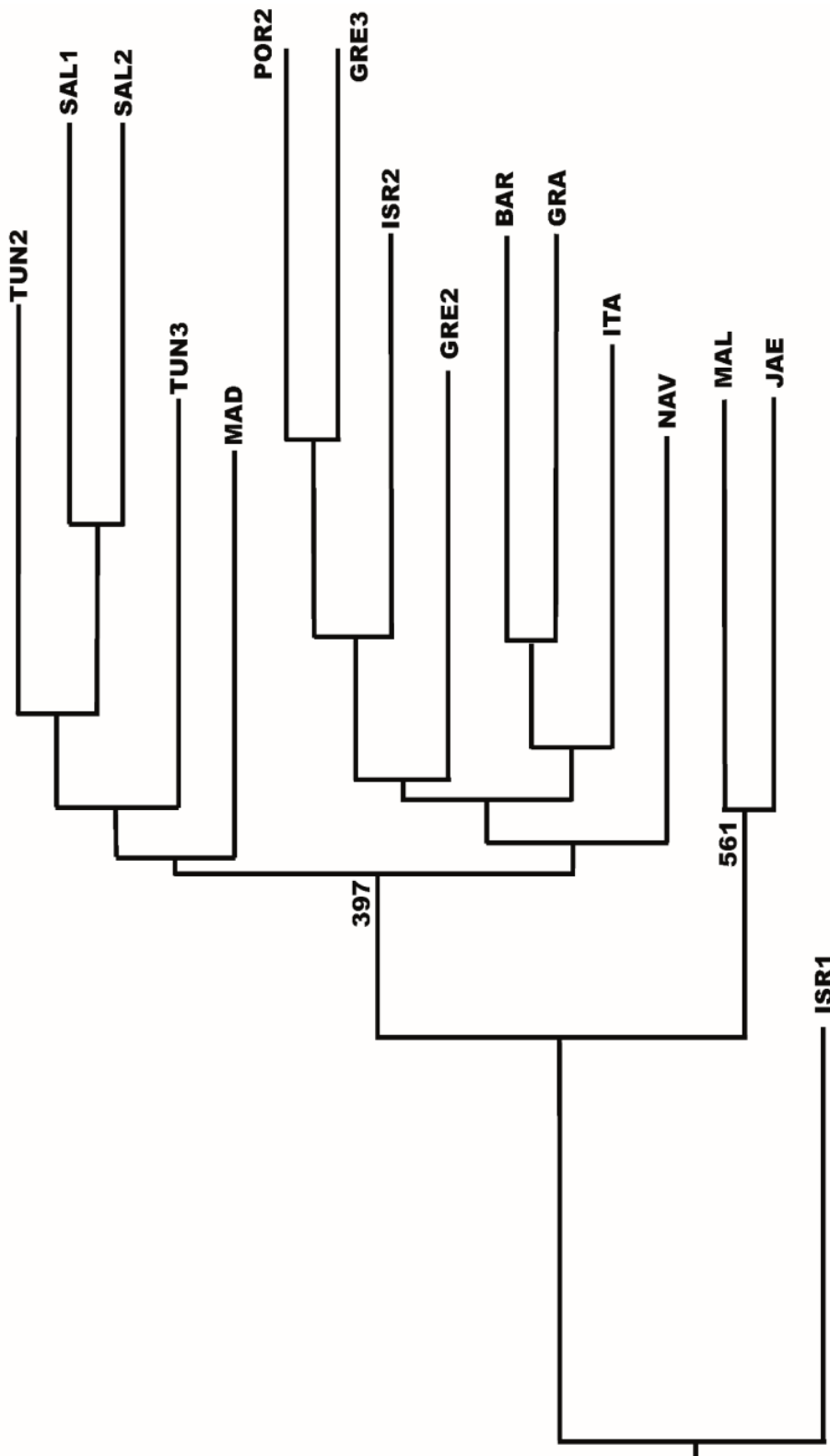


Figura 14F. Dendrograma elaborado por el método del vecino más próximo a partir de las distancias de Nei de las 16 poblaciones de mosca del olivo analizadas mediante marcadores SSR.

Discusión

El objetivo de este capítulo ha sido profundizar en el conocimiento filogeográfico de la principal plaga del olivo, *Bactrocera oleae*, en la cuenca Mediterránea haciendo especial énfasis en las poblaciones ibéricas, hasta ahora menos caracterizadas. Se han empleado dos marcadores moleculares, por un lado, un fragmento del gen mitocondrial que codifica la enzima Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) y por otro, marcadores intermicrosatélites nucleares (ISSR). Determinar la estructura genética y las dinámicas poblacionales de la especie plaga puede ser de gran utilidad para una correcta gestión de las mismas.

El genoma mitocondrial, de herencia matrilineal y sin recombinación es una valiosa herramienta en estudios filogenéticos y evolutivos. Uno de sus genes, el gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) se encuentra altamente conservado en todos los organismos aerobios estudiados (Sarasate *et al.* 1990). No obstante, el análisis de la secuencia completa en insectos reveló que sus distintas regiones evolucionan con ritmos diferentes y que los patrones de variabilidad parecían estar asociados a los distintos dominios de la proteína que codifica, siendo su extremo carboxilo terminal el más variable (Lunt *et al.* 1996). Por este motivo, estas zonas de mayor variabilidad son de gran utilidad en estudios filogeográficos.

El fragmento de COI analizado de 1,151 pb tiene un contenido medio de A+T de 63.4%, similar al aportado al estudiar la molécula completa de esta especie (Nardi *et al.* 2003) y parecido al de otras especies del mismo género como *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons* o *B. tau* 63-69% (Wanwisa *et al.* 2003), al de otros tefrítidos como *Ceratitis capitata*, 77.5% (Spanos *et al.* 2000) y otros insectos en general, como *Chorthippus parallelus*, 69.4% (Lunt *et al.* 1996) *Drosophila melanogaster*, 76% (Han y McPherson, 1997) y *Anopheles gambiae*, 68.6% (Beard *et al.* 1993).

De los 1,151 nucleótidos analizados, 60 fueron variables (Tabla 3F), el 5.21%, muy próximo al de *B. dorsalis* con un 5.94% (Shi *et al.* 2005) y superior a otra especie del mismo género, como *B. curcubitae* con un 1.15% de variación nucleotídica (Hu *et al.* 2008). La mayoría de las sustituciones, el 81.6%, fueron transiciones y el resto transversiones. Estos valores elevados de transiciones también se identificaron en el gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa subunidad II de moscas de la fruta como *Drosophila yakuba* o *D. melanogaster* (62%, Wolstenholme y Clary, 1985) y en otros tefrítidos como *Ceratitis capitata* (62.2%, Segura 2002). Por el contrario, conforme se asciende en la escala taxonómica, en función del tiempo de divergencia que ha transcurrido entre los taxones estudiados, se van acumulando transversiones. Doce de los sesenta SNP se produjeron en la primera base del codón, cinco en

la segunda y cuarenta y tres en la tercera, los cuales son silenciosos y están sometidos a una menor presión de selección. El 15% de estas sustituciones produjeron un cambio de aminoácido no conservativo.

Los parámetros de variabilidad genética de la secuencia del gen COI arrojaron unos valores muy elevados (Tablas 3F y 4F). Se han detectado setenta y tres haplotipos, de los cuales ocho se encontraron a frecuencias intermedias en las poblaciones muestreadas. Los haplotipos restantes se identificaron a bajas frecuencias. La diversidad haplotípica ha sido de 0.86 en las poblaciones de la Península Ibérica (54 haplotipos) y de 0.91 en el Mediterráneo, valores similares o ligeramente superiores a los estimados en otros trabajos de muestras ibéricas con marcadores mitocondriales (*Hd*: 0.88, Van Asch *et al.* 2015; 0.79 ± 0.4 , Nardi *et al.* 2005; 0.82, Matallanas *et al.* 2013). Así mismo, la diversidad nucleotídica en el conjunto de poblaciones mediterráneas (π : 0.0026) y de la Península Ibérica (π : 0.0015) resultó muy parecida a la hallada en un estudio anterior (π : 0.0011 y 0.0019 respectivamente, Matallanas *et al.* 2013).

Estos parámetros fueron también altos al emplear los marcadores nucleares ISSR (Tablas 9F y 10F). El polimorfismo según el criterio del 95 % osciló entre 0.66 y 0.91, del mismo rango que el publicado en otros trabajos de poblaciones ibéricas y poblaciones de la cuenca mediterránea utilizando marcadores moleculares muy variables: 0.8 con ISSR en poblaciones de la Península Ibérica (Hernández *et al.* 2012); 0.51 – 0.70 con marcadores RAPD en poblaciones de la cuenca del Mediterráneo (Segura 2002) y microsatélites (Augustinos *et al.* 2005; Nardi *et al.* 2005; Zygouridis *et al.* 2009). Lo mismo ocurre al comparar los índices de diversidad de Nei, 0.23 – 0.348, o de Shannon, 0.346 – 0.57 con los de Hernández *et al.* (2012) de *H*: 0.289 e *I*: 0.44 respectivamente. Por tanto, los valores de diversidad obtenidos en los análisis de las poblaciones de mosca del olivo de la Península Ibérica en particular, como en la cuenca del Mediterráneo en general, fueron elevados con dos marcadores moleculares utilizados.

En este contexto, Langley y Gillespie (1974) plantearon la existencia de una relación positiva entre la variabilidad genética de una especie y su diversidad ambiental, de manera que aquellas especies capaces de ocupar ambientes diferentes mostrarían un mayor polimorfismo. En el caso de *Bactrocera oleae*, cuyas larvas monófagas dependen totalmente de la aceituna, cabría esperar una baja variabilidad genética. Sin embargo, cuando se compararon los niveles de variabilidad genética con otros tefritidos monófagos como *Rhagoletis pomonella* o *R. completa* y con especies polífagas como *Ceratitis capitata*, capaz de

infestar más de 250 frutales diferentes, se observó que los niveles de variabilidad son mucho más altos en las monófagas (Berlocher y Bush 1982). Nuestros resultados parecen señalar que *Bactrocera oleae* no se ajusta a las expectativas de baja diversidad genética teniendo en cuenta su reducida diversidad ambiental.

La considerable variabilidad genética observada y la presencia de haplotipos exclusivos pueden deberse a un tamaño poblacional grande; las hembras son muy fecundas, capaces de poner más de 200 huevos (Ruiz Castro 1948) y tienen un ciclo polivoltino de entre dos y cinco generaciones por año (Jiménez *et al.* 1994), que se ve favorecido por las actuales condiciones de temperatura y humedad del Mediterráneo (Petacchi *et al.* 2014) y la gran extensión dedicada al cultivo de olivo en la región estudiada. A modo ilustrativo, en el año 2009 en Jaén se contabilizó una media de 19 adultos de mosca del olivo por trampa amarilla a lo largo de 19 muestreos, reflejando la gran densidad poblacional de esta especie en momentos de elevada infestación (Ortega y Pascual 2013). El segundo factor a tener en cuenta sería el largo tiempo que la especie lleva establecida en esta área. Se pensaba que la mosca del olivo llegó a la región mediterránea probablemente alrededor del 1500 – 900 a.C., desde Oriente Medio y África, con la introducción por los fenicios de las variedades domesticadas de olivo (Ruiz 1948; Nardi *et al.* 2005). Sin embargo, análisis genéticos posteriores de todo el genoma mitocondrial de una veintena de moscas del olivo sugieren que *B. oleae* puede haber estado presente en los acebuches del Mediterráneo, desde hace al menos 400,000 años (Nardi *et al.* 2010). Se estima que el complejo de especies del olivo divergió hace unos 4.5 millones de años y los diferentes linajes mediterráneos colonizaron esta región durante el Plioceno (Besnard *et al.* 2007). Conforme los acebuches fueron gradualmente reemplazados por olivos cultivados, la mosca pasaría a hospedar los olivos domésticos donde encontraría un mejor hábitat (Nardi *et al.* 2010).

Mientras que la existencia de poblaciones aisladas y pequeñas conduciría a divergencia entre poblaciones y homogeneidad dentro de las mismas, las poblaciones grandes y comunicadas entre sí tendrían una menor diferenciación y una mayor diversidad dentro de las mismas (Lin *et al.* 1999; Downie 2000). Al examinar los valores de los parámetros de diferenciación genética con ambos tipos de marcadores moleculares en las poblaciones de la Península Ibérica (Tablas 5F, 6F, 11F y 12F) se aprecia que éstas no sufren diferenciación, sino que presentan unos patrones similares de diversidad genética, con un F_{ST} promedio de 0.01 y una estimada de flujo genético matemáticamente ilimitado. Esta similitud también se aprecia de manera gráfica en los análisis de componentes principales (Figuras 5F y 13F) y en los dendrogramas (Figuras 9F y 14F). Por tanto, los resultados obtenidos apuntan a la existencia

de una única gran población ibérica de mosca del olivo en lugar de varias pequeñas y aisladas, apoyando los análisis previos de nuestro grupo (Segura *et al.* 2008; Matallanas *et al.* 2013). Estos resultados tienen una considerable importancia en términos de gestión de plagas, ya que la extensión olivarera española de más de 2.5 millones de hectáreas facilita el flujo genético entre las distintas poblaciones de *Bactrocera oleae*.

Atendiendo a los valores de los índices de fijación F_{ST} (Tabla 5F) y los resultados de los análisis AMOVA (Tabla 6F) del marcador mitocondrial, las tres poblaciones de Israel y las tres de Túnez también pueden ser consideradas como dos metapoblaciones. En cambio, se observa heterogeneidad entre las poblaciones de mosca del olivo de Grecia; Grecia 1 y Grecia 2 son genéticamente muy similares y a su vez más próximas a las poblaciones de Italia y Túnez, mientras que la población de Grecia 3, la más meridional, tiene un patrón de diversidad genética semejante al de las poblaciones de Israel (Figura 5F). Nuestro trabajo pone de manifiesto la sensibilidad del marcador mitocondrial para detectar por primera vez esta heterogeneidad genética entre poblaciones de *B. oleae* de Grecia, mientras que los marcadores ISSR no reflejaron diferenciación de las mismas (Tabla 11F y Figura 13F). Tampoco en la bibliografía consultada los estudios que analizaron con marcadores nucleares una muestra amplia de Grecia (Augustinos *et al.* 2005; Zygouridis *et al.* 2009) encontraron diferenciación genética entre estas poblaciones.

Por último, el análisis espacial de la varianza molecular (Figura 6F), los índices de diferenciación entre poblaciones de distintos países (Tabla 5F), los análisis de componentes principales (Figura 5F) y el AMOVA (Tabla 6F) realizados a partir de la información mitocondrial, revelan una notable estructura genética en el área mediterránea, asignando las poblaciones muestreadas a dos grupos genéticos que se han denominado *Este* (Grecia 3 e Israel) y *Oeste* (Península Ibérica, Túnez, Italia y Grecia 1 y 2) con subestructura en este grupo, discriminando las poblaciones de la Península Ibérica, Italia y Túnez, que constituirían entidades genéticas diferentes.

La representación de las frecuencias haplotípicas de cada población (Figura 4F) y la red de haplotipos o *network* (Figura 7F) revelan igualmente esta distribución no homogénea de la variabilidad genética con dos haplogrupos bien diferenciados que se corresponden con los dos grupos de poblaciones definidos. Los haplotipos H1 y H17, que difieren en un SNP, son los más frecuentes y junto con los 57 haplotipos que derivan de ellos, constituirían el grupo genético que hemos denominado *Oeste*. H17 es el que tiene una distribución geográfica más amplia, presente en poblaciones mosca del olivo de Italia, Grecia, Túnez y en menor frecuencia en las

poblaciones de España y la red lo designa como el haplotipo ancestral. El haplotipo H22 es el tercer haplotipo de mayor frecuencia, está en las poblaciones de Grecia e Israel; difiere de H1 y H17 en 4 y 3 SNP respectivamente. Los haplotipos, H21 y H22, junto con siete haplotipos exclusivos de poblaciones de Israel y 4 abaja frecuencia en Grecia e Israel, constituyen el grupo genético *Este*.

Estos patrones de variación se ven apoyados por las reconstrucciones filogenéticas (NJ, MP e IB, Figura 9F) al separar en dos ramas los haplotipos característicos del *Este* de los haplotipos encontrados en el *Oeste*, si bien estas ramas no presentaron un soporte estadístico alto. Así mismo, en el árbol basado en máxima parsimonia (MP, Figura 9) y en el PCoA (Figura 5F) se puede apreciar cierta subestructura genética dentro del grupo *Oeste*, ya que los haplotipos característicos de la Península Ibérica agrupan juntos.

El principal factor que habría conformado la estructura poblacional detectada sería el flujo génico entre las poblaciones de cada grupo y una ausencia de intercambio genético entre ambos (Tabla 7F). El cultivo intensivo del olivo en la cuenca del Mediterráneo, donde se concentra más del 90% de la producción mundial, favorecería la existencia de estos patrones de distribución de la diversidad genética detectada, el intercambio genético y la homogenización de las poblaciones de *Bactrocera oleae* dentro de estas dos regiones genéticamente diferenciadas. Se ha descrito que las moscas de esta especie son capaces de cubrir notables distancias (Skouras *et al.* 2007). El conocimiento sobre la capacidad migratoria de *B. oleae* proviene en su mayor parte de métodos directos tales como el marcaje-liberación-recaptura y los experimentos de laboratorio. La migración de la mosca depende en gran medida de la disponibilidad de frutos. Normalmente, si se dispone de frutos, los adultos se dispersan unos pocos cientos de metros, mientras que en casos de escasez de aceitunas pueden viajar varios kilómetros en pocos días. Las mayores distancias registradas han sido de 4 km en Creta (Economopoulos *et al.* 1978), 10 km en la antigua Yugoslavia (Brnetic *et al.* 1981) y 10 kilómetros en mar abierto (Rice 2000). La posible dispersión pasiva a través de frutos infestados, sería otro punto a considerar ya que la aceituna y el aceite de oliva son alimentos básicos de dieta mediterránea. Si bien la mayor parte de los movimientos y las exportaciones que se realizan son de aceitunas en conserva o directamente aceite de oliva (Segura 2002), en las almazaras se utilizan aceitunas de diferentes localidades y normalmente las aceitunas (algunas infestadas) permanecen unos días antes de la maceración y extracción, tiempo adecuado para que los adultos puedan emerger e infestar los huertos de los alrededores, modificando la composición genética de las poblaciones locales, como describieron Skouras *et al.* (2007) estudiando poblaciones orientales de Grecia, Chipre y Creta. Los métodos indirectos,

moleculares, también revelan información sobre la migración de *B. oleae*, como en este trabajo (Tabla 7F) y en otros sobre poblaciones mediterráneas (a modo ilustrativo, en 19 poblaciones fundamentalmente del Mediterráneo oriental $N_m = 6.16$, Augustinos *et al.* 2005).

Los primeros estudios genéticos de poblaciones mediterráneas de *Bactrocera oleae* no encontraron evidencias de diferenciación genética entre ellas (Nardi *et al.* 2005) si bien las poblaciones tunecinas diferían de las europeas (marcadores RAPD, Segura 2002; 2008). Los estudios del grupo de Augustinos con marcadores microsatélites (Augustinos *et al.* 2005; Zygouridis *et al.* 2009) señalaron la existencia de grupos genéticos de *B. oleae* a nivel local, pero con algunas discrepancias entre ambos trabajos, bien dos grandes grupos: la Península Ibérica e Italia frente a Grecia y Turquía (2005) o bien tres grupos genéticos: la Península Ibérica; Italia y Grecia; Israel y Chipre (2009). Nardi *et al.* (2010) secuenciaron el genoma mitocondrial completo de 21 moscas y observaron diferenciación genética entre las poblaciones del Este y las del Centro – Oeste, con una tercera subdivisión, aunque con un soporte débil (la Península Itálica), compatible con niveles medios de flujo génico (Nardi y Frati 2011). Los análisis filogeográficos mediante fragmentos mitocondriales de muestras de Portugal, incluyendo otras secuencias de *GeneBank* mostraron subestructura en el área Centro – Oeste, discriminando genéticamente las poblaciones de *B. oleae* de las tres Penínsulas (van Asch *et al.* 2012); al aumentar el análisis con más muestras de Italia y la Península Ibérica concluyeron que las poblaciones italianas, eran marcadamente distintas de las ibéricas y las orientales y más diversas de lo anteriormente se había descrito e igualmente existía una marcada diferenciación entre las poblaciones de mosca del olivo de las poblaciones del Este y de las del Centro – Oeste, (van Asch *et al.* 2015). Estos autores señalan que ni los Alpes ni los Pirineos actuarían como barrera geográfica para esta especie, siendo el sur de Francia una región de mezcla de las poblaciones Ibéricas e italianas.

Estos resultados, de gran relevancia para conocer los patrones de diversidad genética de la especie plaga, también evidencian que sigue faltando una perspectiva clara de la estructura de *B. oleae* en la cuenca mediterránea, donde se concentra la mayor parte de la producción olivarera mundial. Para conseguir mayor resolución, hemos analizado 12 muestras de otros países mediterráneos junto con las 16 muestras españolas. El notable aumento de las muestras del presente trabajo apoya firmemente la existencia de dos poblaciones mediterráneas, claramente distintas *Este / Oeste* con una subestructura regional adicional discriminando las poblaciones de la Península Ibérica de las Túnez e Italia, que constituirían entidades genéticamente diferenciadas, incluyendo por primera vez algunas muestras septentrionales de Grecia por su similitud genética con las tunecinas. Estos resultados apoyan

lo apuntado por nuestro grupo en un trabajo preliminar empleando como herramienta el mismo marcador mitocondrial, donde las poblaciones de *B. oleae* de Túnez, Italia y la Península Ibérica constituirían grupos aislados, englobados en el cluster *Oeste* (Matallanas *et al.* 2013).

Hay que considerar que a la controversia sobre el número de subpoblaciones mediterráneas de la mosca del olivo contribuyen los resultados obtenidos al estudiar diferentes tamaños muestrales y con diferentes marcadores moleculares tal y como se ha visto reflejado en el presente trabajo empleando marcadores nucleares ISSR y el gen mitocondrial COI. La herencia matrilineal y la ausencia de recombinación del genoma mitocondrial ofrecerían una visión más antigua del proceso evolutivo de esta especie, permitiendo identificar con mayor claridad los grupos genéticos de *B. oleae* en el Mediterráneo. Los análisis realizados con los intermicrosatélites ponen de manifiesto la variabilidad genética que albergan las poblaciones de esta especie monófaga, pero no detectan esta estructura, si bien una tendencia a la diferenciación de las poblaciones del mediterráneo más oriental (Figuras 13F y 14F). Este resultado evidencia la importancia de emplear varios marcadores moleculares en los análisis filogeográficos, de utilidad para el desarrollo de mejores estrategias de manejo y control de una importante plaga en la agricultura mediterránea.

El segundo factor que ha contribuido a conformar la estructura genética de las poblaciones de *B. oleae* revelada por el marcador mitocondrial lo constituirían las distintas rutas de colonización que habría seguido la especie. La variabilidad genética de una especie tiende a descender en un gradiente a lo largo de su ruta de colonización. Algunos autores al analizar con microsatélites poblaciones europeas de la cuenca mediterránea observaron una disminución gradual de la heterocigosidad desde Oriente hacia la parte occidental del Mediterráneo y postularon una expansión de la especie hacia el oeste a lo largo de las tres penínsulas (Augustinos *et al.* 2005; Zygouridis *et al.* 2009). Así, se ha propuesto una expansión de la plaga en paralelo a la difusión del olivo cultivado, situando el origen del mismo en Siria e Irán en torno al 5,000 a.C. Esta variedad cultivada se extendería a otras regiones siguiendo las rutas comerciales de fenicios, griegos y romanos a lo largo de las tres penínsulas Mediterráneas (Domínguez 2012).

Por el contrario, otros autores plantean la posibilidad de que la mosca del olivo ya estuviese establecida en la variedad silvestre, como ya se ha comentado y la estructura genética detectada tendría un componente más antiguo, asociado a la fragmentación de su hospedador, el olivo, en diferentes refugios glaciares (Nardi *et al.* 2010; Nardi y Frati 2011). El

complejo de especies del olivo tendría su origen en el centro - este del continente africano. Los cambios climáticos o el incremento de la aridez en el Sáhara en el Plioceno pudieron contribuir a la diferenciación en la subespecie *cuspidata*, característica de Sudáfrica y Asia, y *europaea*, la mediterránea, hace unos 4.5 millones de años (Rubio de Casas *et al.* 2006; Besnard *et al.* 2007; Besnard *et al.* 2009). Tras colonizar la cuenca Mediterráneo, se estima que la divergencia de los tres linajes de *O. e. subsp. europaea* tuvo lugar hace unos 284,000 – 139,000 años, antes de la última glaciación. La estructura genética actual del acebuche refleja un patrón de distribución geográfico muy marcado coincidente con los refugios glaciales de las tres penínsulas mediterráneas.

Por tanto, a pesar de su abundancia y relevancia en las variedades cultivadas de la región mediterránea, varios autores proponen que la mosca del olivo probablemente se originó en regiones del África subsahariana de donde procede el complejo de especies del olivo (Zohary 1994; Daane y Johnson 2010). Aunque la determinación del origen geográfico de *Bactrocera oleae* sigue siendo controvertido, se han identificado poblaciones subsaharianas, mediterráneas y pakistaníes genéticamente distintas, la última descrita anteriormente como variedad asiática (Nardi *et al.* 2010). Las especies más próximas de *B. oleae* son de origen africano (White 2000; Segura *et al.* 2006) y en África, más que en el Mediterráneo, se produciría el origen de esta especie que infesta los olivos (Daane y Johnson 2010).

La adición en nuestros análisis de otras 31 secuencias del gen COI disponibles en Genbank, corrobora la distribución de la variabilidad genética que hemos detectado en el Mediterráneo y además, la enriquece (Figura 8F). Estas secuencias, bien se englobaron dentro de los haplotipos mayoritarios del haplogrupo asociado a la región geográfica donde estos individuos fueron muestreados (como Italia e Israel), excepto algunas de Grecia que presentaban haplotipos asociados al grupo Oeste (H2) o H17, el más distribuido, o bien las secuencias de las moscas definen nuevos haplotipos exclusivos, pero siempre estrechamente relacionados con los haplotipos mayoritarios de los haplogrupos detectados, como es el caso de las moscas de Argelia, Portugal, Marruecos (haplogrupo del Oeste) y Turquía (haplogrupo del Este).

La red permitió apreciar 4 grupos genéticos: los haplotipos de Paquistán (H77-79), el haplotipo encontrado en las muestras del sur de África H76 (Sudáfrica y Kenia), que sería el más antiguo dada la posición en la red de *Bactrocera dorsalis*, una especie de tefrítido filogenéticamente muy próxima, y los haplogrupos aquí definidos como Oeste (España, Portugal, Italia, parte de Grecia, Argelia, Marruecos y Túnez) y Este (Grecia, Israel, Turquía y

Estados Unidos). Hay que señalar que el haplotipo detectado en el sur de África, H76, sólo difiere en un nucleótido del haplotipo H17, el que presenta una distribución más amplia por la cuenca Mediterránea y presente en todos los países analizados, excepto en Israel, y que sería el ancestral de los 73 haplotipos que hemos detectado en la cuenca mediterránea

Puesto que todas las muestras californianas portaban el haplotipo H22, característico de moscas del olivo de Israel y Grecia, hace pensar que las poblaciones de *Bactrocera oleae* de Estados Unidos se han establecido recientemente y no ha transcurrido suficiente tiempo para diferenciarse de las mediterráneas. Nuestros análisis confirman que la infestación americana parece proceder de la zona mediterránea oriental, como sugirieron otros autores (Segura 2002; 2008; Zygouridis *et al.* 2009), empleando marcadores nucleares.

El haplogrupo que define a las muestras de Paquistán presenta una clara diferenciación del resto, distando en hasta cinco SNP de los haplotipos de las poblaciones del continente africano, lo que parece indicar una divergencia temprana de la muestra de Pakistán. Los estudios realizados con microsatélites y DNA mitocondrial (Zygouridis *et al.* 2009; Nardi *et al.* 2005, 2010) confirmarían esta idea, una separación relativamente antigua de este grupo más oriental, donde el aislamiento, el reducido tamaño poblacional y la deriva génica moldearían la estructura actual de esta población. Dado el pequeño tamaño muestral analizado, resulta necesario un estudio más amplio para corroborar esta idea.

La elevada diversidad genética encontrada en las poblaciones de España y la presencia de haplotipos exclusivos (Tablas 3F y 4F) no corroboraría la hipótesis del origen de *B. oleae* en el mediterráneo oriental y su posterior colonización de la Península Ibérica. Esta acusada diversidad puede atribuirse a unas condiciones climáticas muy favorables para la propagación de la especie, a una extensa presencia de olivo, y/o a que lleva tiempo establecida en esta región, como se ha discutido. Las inferencias demográficas realizadas a partir de nuestros datos genéticos estiman una expansión en nuestro país hace unos 66,000 años, en el Pleistoceno, cuando las fluctuaciones climáticas causaron un gran impacto en la distribución y evolución de las especies de las regiones templadas (Corrales *et al.* 2013). La misma tendencia se aprecia en los grandes grupos genéticos del Mediterráneo, si bien la última expansión estimada en el Este es ligeramente anterior. Nardi *et al.* (2010) estimaron una diversificación basal de la mosca del olivo en el Mediterráneo hace unos 459,000 años, la cual se ajustaría con la colonización durante el Cuaternario, no con la introducción de la aceituna cultivada en el Holoceno.

Así pues, el probable origen africano del olivo y estos resultados genéticos, parecen indicar que las rutas de colonización de la mosca irían en paralelo con las del olivo. Los niveles y patrones de diversidad genética detectados no serían compatibles con la uniformidad que cabría esperar si *Bactrocera oleae* hubiese sido introducida mediante una única vía desde Oriente Medio junto con el cultivo del olivo. Por tanto, la hipótesis más plausible sería una antigua población africana de *B. oleae*, cuya estructura a un nivel más local aún no está bien definida, que se expandiría colonizando Asia (hace unos 827,000 años) y el Mediterráneo (hace unos 565,000 años) (Nardi *et al.* 2010), con sucesivos eventos fundadores característicos de estos eventos de colonización con gran expansión.

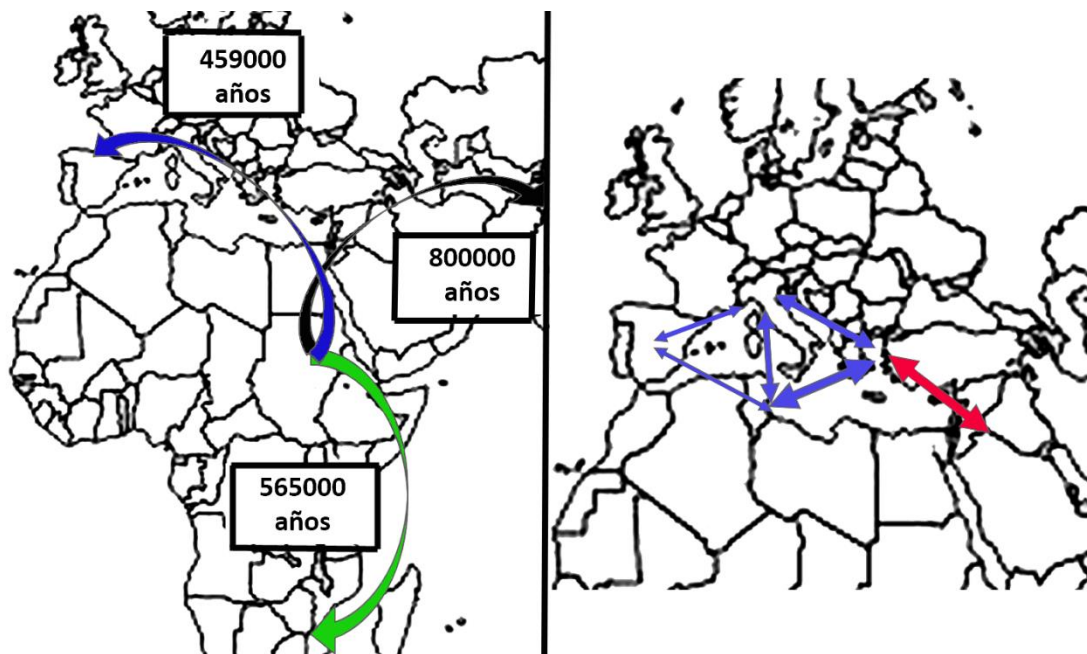


Figura 15F. Izquierda: mapa con las rutas de colonización de la especie originando los 3 grupos a nivel mundial (basado en Nardi *et al.* 2010). Derecha: Mapa con las posibles rutas de colonización de la especie en el Mediterráneo de acuerdo a los datos obtenidos en el presente trabajo.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en la Figura 15F se muestra un mapa con el posible origen de *Bactrocera oleae* en el continente africano y las rutas de colonización que originarían los tres grandes grupos genéticos detectados a lo largo de su distribución mundial. La flecha negra corresponde a la ruta que seguiría el grupo establecido en Paquistán mientras que la flecha

verde marca la ruta que habrían seguido las poblaciones de Kenia y Sudáfrica. En color azul se señalan las rutas que seguiría *Bactrocera oleae* en el Mediterráneo. La primera iría hacia Oriente Medio y recorrería las penínsulas de este a oeste. La segunda ruta discurriría en paralelo por el norte de África continuando por las Penínsulas Ibérica e Itálica. Un análisis más completo que incluya muestras de *Bactrocera oleae*, especialmente del centro y sur de África, de Asia central y de Oriente Medio resulta necesario para confirmar el origen y estas rutas de dispersión de la especie.

En definitiva, el análisis conjunto de dos marcadores moleculares, mitocondriales y nucleares, ha resultado de enorme utilidad en el estudio filogeográfico de la mosca del olivo revelando unos valores de diversidad genética muy elevados en las poblaciones españolas, en comparación con los descritos en previos estudios de otros autores, con un marcado patrón de distribución geográfica en la cuenca mediterránea. La combinación de dos marcadores moleculares en el análisis poblacional proporciona robustez a los resultados obtenidos, siendo éste uno de los escasos análisis filogeográficos de la mosca del olivo que emplea marcadores tanto nucleares como mitocondriales. Se han identificado dos grandes grupos genéticos, *Este* y *Oeste*, con una marcada subestructura en este último grupo. Estas poblaciones llevan largo tiempo asentadas en la cuenca del mediterráneo e infestarían el olivo silvestre o acebuche antes de su domesticación, estimando su última expansión en el mediterráneo hace unos 61,500 años.

Toda la información obtenida en este estudio resultará de gran relevancia en los programas de control de *B. oleae* dado el impacto derivado de su presencia en los olivares, de la especificidad de las medidas clásicas de gestión basadas en el uso de insecticidas, del notable aumento de resistencias a los mismos y de la estricta normativa europea sobre el uso de fitosanitarios.

Capítulo 2

Frecuencia y distribución de las mutaciones que confieren resistencia a organofosforados.

Introducción

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) define los pesticidas como productos que previenen, destruyen o controlan plagas y enfermedades y protegen las plantas y sus productos durante las fases de producción, almacenamiento y transporte. Los insecticidas quedan englobados en el grupo de los pesticidas.

En la actualidad, la aplicación de insecticidas para el control de plagas se encuentra altamente regulada por normativas europeas (Directiva 2009/128/CE) y por los Planes de Acción Nacional (PAN) de cada país comunitario (RD 1311/2012, BOE-A-2012-11605). En España, el Real Decreto RD 1311/2012 establece un marco de actuación para el uso sostenible de los productos fitosanitarios, con listados de las explotaciones agrarias de obligado asesoramiento, entre ellos, los olivares. Este asesoramiento queda justificado mediante el contrato entre asesor y productor. La documentación sobre la descripción de la explotación asesorada, incluye el estado fitosanitario y los productos a usar en la misma. Por último, se crea un registro de actuación, en el que debe figurar cada intervención química realizada en la parcela (Artículo 11 RD 1311/2012). Los listados de productos autorizados, las dosis máximas permitidas de los mismos y las sugerencias sobre tratamiento están disponibles en las bases de datos del Ministerio de Agricultura y Pesca Alimentación y Medioambiente (MAPAMA). No obstante, a pesar de los esfuerzos realizados para una mejor gestión de los productos químicos, de la información proporcionada y de las campañas formativas anuales, el informe del PAN del año 2016 reflejó incidencias en cuanto a la aplicación indebida de los productos regulados, la aplicación y venta de productos ilegales y el empleo de productos no regulados (Informe PAN 2016, MAPAMA).

Estos productos químicos se han utilizado para el control de plagas desde mediados del siglo XX. La introducción de insecticidas sintéticos en los años cuarenta (Dicloro Difencil Tricloroetano y organofosforados [OP]), mejoró considerablemente el control y redujo la expansión de diferentes plagas de insectos (Sparks y Nauen 2014). Pero, el empleo abusivo de los insecticidas desde los años 60 también ha derivado en el aumento notable de especies de artrópodos con resistencias a los mismos (Heckel 2012), lo que se refleja en el fracaso del pesticida cuando se aplica de acuerdo a los niveles recomendados para esa determinada especie (IRAC, <http://www.irac-online.org>).

El Comité de Actuación de Resistencias a Insecticidas (IRAC) surgió en los años 80 como un consorcio de compañías de protección vegetal dedicadas a la mejora de los productos para el control de plagas que derivase en una gestión efectiva de resistencias y una agricultura más

sostenible (Sparks y Nauen 2014). Este consorcio pone de manifiesto que el abordaje más efectivo para combatir las resistencias es hacer lo máximo posible para que ésta no surja. Para ello se recomiendan programas de gestión integrada de plagas con diferentes estrategias de monitorización de la densidad de la plaga en el campo. Asimismo, el IRAC resalta que el tratamiento con los insecticidas debe realizarse únicamente cuando la densidad de insectos presentes en el cultivo pueda causar unas pérdidas económicas superiores a las de compra y aplicación de dichos productos.

Tal y como describen Feyereisen *et al.* (2015), las mutaciones que confieren resistencia a los insecticidas pueden clasificarse en tres grandes grupos. Por un lado, las mutaciones que incrementan los niveles de expresión del gen implicado en la resistencia, sin cambiar el número de copias. Un ejemplo de este mecanismo es el gen *cyp6d1* que codifica la enzima de detoxificación citocromo P450 en la mosca doméstica, donde una delección de 15 pares de bases en el extremo 5'UTR impide la unión de represores de transcripción (Gao y Scott 2006). En otras ocasiones la resistencia a los insecticidas es consecuencia del silenciamiento del gen cuyo producto proteico es la diana del insecticida, como ocurre en lepidópteros con genes que codifican fosfatasa alcalinas frente a las proteínas del maíz Bt Cry1A y Cry1C. Este proceso es poco frecuente y en algunas ocasiones se asocia a la sobreexpresión de otros genes que compensan esta pérdida de función (González-Cabrera *et al.* 2013). Finalmente, se encuentran las mutaciones puntuales y pequeñas delecciones que afectan a la secuencia codificante de estos genes implicados en las resistencias y que son las mutaciones responsables de la resistencia a los insecticidas organofosforados de la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Vontas *et al.* 2002).

La enzima acetilcolinesterasa es la diana de los productos organofosforados, que actúan bloqueando el centro activo de la misma. En condiciones fisiológicas, dicha enzima se encarga de degradar el neurotransmisor acetilcolina, una vez ha ejercido su acción en la hendidura sináptica. La degradación del neurotransmisor detiene su efecto sobre otras neuronas o sobre la unión neuromuscular. Los productos organofosforados, carbamatos y organoclorados, bloquean irreversiblemente el centro activo de esta enzima por lo que no se degrada la acetilcolina, lo que deriva en la parálisis prolongada del insecto y con ello su muerte (Vontas *et al.* 2002).

La enzima acetilcolinesterasa está codificada por el gen *ace*. Algunos animales como nematodos y arácnidos presentan varios loci, pero en insectos solo se han descrito dos (*ace1* y *ace2*), parálogos, cuya duplicación se produjo antes de la divergencia de los insectos. En la

mayoría de ellos, el locus *ace1*, tiene altos niveles de expresión, y se ha asociado frecuentemente con las resistencias a insecticidas, pues la enzima presenta una elevada actividad catalítica. El locus *ace2* parece tener una función más limitada u otras funciones neuronales (Lee *et al.* 2014).

A lo largo de la evolución de los dípteros, el suborden Cyclorrhapha, que incluye especies como *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica* o *Bactrocera oleae*, ha perdido el locus *ace1* (Cha *et al.* 2015). Por tanto, el locus *ace2* es el implicado en las resistencias a los insecticidas organofosforados (Vontas *et al.* 2011).

En el caso concreto de la especie *Bactrocera oleae*, este gen tiene un tamaño aproximado de 75 kb con 9 intrones, algunos de hasta 14 kb, y 10 exones, siendo el primero no codificante (Figura 1R). Los exones III – IX forman parte de la subunidad catalítica de la enzima y están altamente conservados en los insectos. El exón X, que contiene el codón de fin, codifica una región de anclaje a los grupos fosfatidil inositol de la membrana (Kakani *et al.* 2013a).

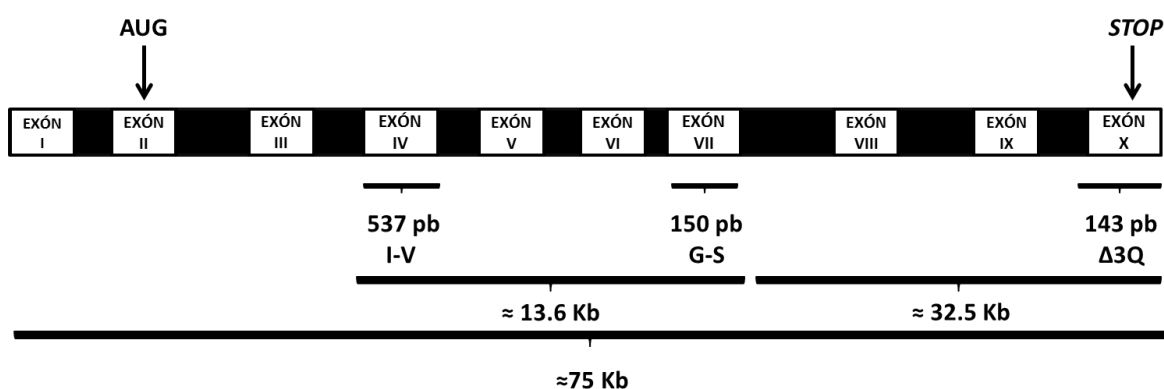


Figura 1R. Esquema del gen *ace* con las mutaciones descritas en los exones IV, VII y X en *B. oleae* (adaptado de Kakani *et al.* 2013a).

En la actualidad hay descritas tres mutaciones en el gen *ace* de *B. oleae* relacionadas con la insensibilidad a los organofosforados, dos de ellas son puntuales y la tercera es una delección. La primera mutación puntual descrita en el gen *ace*, I214V, se encuentra en el exón IV. Se trata de un polimorfismo producido en la primera base del codón que ocasiona un cambio de aminoácido no sinónimo, una isoleucina es sustituida por una valina, en las proximidades del centro catalítico (Kakani *et al.* 2013a). Este cambio reduce la capacidad del insecticida para unirse a la enzima e inutilizar el centro activo y es equivalente a I199V de *D. melanogaster* (Mutero *et al.* 1994) o a I214V de *Bactrocera dorsalis* (Hsu *et al.* 2006).

La segunda mutación puntual que confiere resistencia se localiza en el exón VII, G488S, y es debida a otro cambio no sinónimo, el aminoácido glicina es reemplazado por una serina. Este residuo de glicina se encuentra altamente conservado en la filogenia y parece tener una función esencial en el mantenimiento de la conformación del centro activo de la acetilcolinesterasa. El polimorfismo conlleva la reducción de la actividad enzimática entre un 30 y un 40% y un incremento notable de la resistencia a insecticidas (Vontas *et al.* 2002). Esta mutación es similar a G365A descrita en *Musca domestica* y a G488S identificada en *B. dorsalis* (Hsu *et al.* 2006)

La tercera y última mutación descrita en *B. oleae* relacionada con la insensibilidad a los insecticidas organofosforados se encuentra en el exón X. A diferencia de las anteriores, no es un polimorfismo puntual en la secuencia de DNA sino una delección de 9 pares de bases en la región carboxilo terminal que supone la pérdida de tres glutaminas. Esta modificación implica un incremento de afinidad de la enzima por el fosfatidil inositol de la membrana y, por tanto, un anclaje más prolongado a la membrana celular y con ello el mantenimiento de la actividad enzimática (Kakani *et al.* 2008; Vontas *et al.* 2011).

La aplicación de insecticidas organofosforados en los olivares mediterráneos se realiza desde mediados del siglo XX y se han detectado alelos resistentes en las poblaciones naturales de la mosca del olivo en esta área a lo largo de las últimas décadas. En la bibliografía encontramos cinco trabajos en los que se han detectado estas mutaciones en las poblaciones de *B. oleae* de la cuenca mediterránea, si bien, con diferencias en cuanto a su frecuencia y distribución. Los primeros estudios observaron una frecuencia considerable de alelos resistentes en los exones IV y VII en las poblaciones de Grecia e Italia, pero nula o muy reducida en la Península Ibérica, aunque solo incluyeron 9 individuos de Andalucía (Hawkes *et al.* 2005) y 10 de Portugal (Nardi *et al.* 2006). Posteriormente, Pereira - Castro *et al.* (2015) analizaron una muestra más amplia de la Península Ibérica con 9 poblaciones portuguesas y 4 andaluzas. Las frecuencias de alelos resistentes resultaron moderadas en las poblaciones andaluzas, mientras que en Portugal había una mayor frecuencia de los alelos sensibles. Finalmente, dos estudios han analizado la frecuencia de la delección en el exón X (Kakani *et al.* 2013b; Dogaç *et al.* 2014), reflejando una frecuencia muy reducida del alelo resistente en las poblaciones muestreadas, entre ellas sólo una de España, y sin un patrón de distribución geográfico.

Teniendo en cuenta la importancia del olivo en la economía española y la escasa caracterización de la frecuencia y distribución de las resistencias a los insecticidas

organofosforados en nuestro país, el principal objetivo de este capítulo fue el análisis de la frecuencia y distribución de estas tres mutaciones descritas en el gen *ace* en las poblaciones españolas de *B. oleae*, incluyendo algunas poblaciones de otros países de la cuenca Mediterránea para ampliar esta perspectiva.

Como se ha indicado anteriormente, el incremento en la frecuencia y distribución de alelos resistentes a los diferentes pesticidas empleados en el control de plagas constituye un reto para el sector agroquímico. La presencia de poblaciones de insectos resistentes resulta un elemento crítico si se quiere realizar un empleo racional de los productos químicos buscando salvaguardar su eficacia a largo plazo. Por ese motivo, toda la información obtenida será de especial interés para el sector productivo, permitiendo una gestión más adecuada de la mosca del olivo que repercuta en un menor impacto ambiental.

Material

Para el estudio de las mutaciones en el gen *ace* se han analizado 115 ejemplares adultos de *Bactrocera oleae* procedentes de 12 muestras representativas de España. También se han incluido 3 muestras de Grecia, 3 de Israel, 1 de Italia, 2 de Portugal y 2 de Túnez. (Tabla1R).

CÓDIGO	LOCALIDAD/PAÍS	LATITUD	LONGITUD	N
BAD	Montemolín, Badajoz, ES	38.1552	-6.2069	10
BAL	Mallorca, Islas Baleares, ES	39.6952	3.0175	11
CAC	Castañar de Ibor, Cáceres, ES	39.6277	-5.4166	10
COR	Campus de Rabanales, Córdoba, ES	37.2647	-4.6327	10
GER	El Cortalet, Gerona, ES	42.2253	3.0970	10
GRA	Íllora, Granada, ES	37.3461	-3.8727	10
JAE	La Iruela, Jaén, ES	37.9469	-2.9583	10
MAD	Morata de Tajuña, Madrid, ES	40.2275	-3.4369	10
NAV	Arróniz, Navarra, ES	42.4222	-2.0913	10
TAR	Tortosa, Tarragona, ES	40.811	0.5209	9
TER	La Portellada, Teruel, ES	40.89	-0.0336	9
VAL	Requena, Valencia, ES	39.4878	-1.1003	6
POR1	Fundao, PT	40.1369	-7.4994	7
POR2	Lisboa, PT	38.7069	-9.1356	6
ITA	Diana Marina, Liguria, IT	43.9098	8.0818	10
TUN1	Sidi Thabet, TN	36.9081	10.0222	10
TUN3	Zarzis, TN	33.523	11.0852	10
GRE1	Agia, GR	39.7188	22.7550	10
GRE2	Tesalonica, GR	40.6393	22.9446	9
GRE3	Atenas, GR	37.9791	23.7166	10
ISR1	Jerusalem, IL	31.7383	35.2137	9
ISR2	Rehovot, IL	31.8927	34.8112	10
ISR3	Lahav Forest, IL	31.3725	34.8408	10

Tabla 1R: Poblaciones mediterráneas de la mosca del olivo en las que se ha estudiado la frecuencia de resistencias a insecticidas organofosforados. N, número de individuos analizados en cada población. ES: España, PT: Portugal, TN: Túnez, GR: Grecia, IL: Israel.

Métodos

1. Extracción del DNA

El DNA genómico se extrajo de adultos de *B. oleae* empleando el *DNeasy Blood and Tissue kit* de *Qiagen* (Valencia, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante e incluyendo un tratamiento con RNasa A a 37°C durante 30 minutos. Se eluyó en 90 µl de tampón TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM, pH 8) y se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

La integridad del material genético se valoró mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa al 0.8% en tampón TBE 0.5X (Tris-Borato 0.045 M; EDTA 0.001 M, pH8) teñidos con bromuro de etidio (1 µg / mL). Como patrón de peso molecular se empleó una digestión del Fago Lambda con la enzima de restricción *Pst I* (50 ng / µL). Los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Quantum ST5, Labtech) y se obtuvieron las imágenes con una cámara acoplada a un sistema de captura y análisis de imágenes (VisionCapt V16.08). La concentración del DNA genómico también se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm empleando un espectrofotómetro NanoDrop®ND-100 (Nanodrop Technologies, Willmington, EEUU). Tras ello, se realizaron alícuotas de DNA a 5 ng/µL para los análisis posteriores.

El estudio de la frecuencia de mutaciones en estos tres exones se realizó mediante dos aproximaciones diferentes. El exón IV se analizó por PCR y posterior secuenciación. En el caso del exón VII, la mutación que confiere resistencia a los OP lleva asociada un polimorfismo neutro a 9 pares de bases (pb) que implica la pérdida de la diana de la endonucleasa *BssHII*. En el caso del exón X, la delección de 9 pares de bases responsable de la resistencia implica la pérdida de la diana de la enzima de restricción *MwoI*. Por ese motivo, la presencia de alelos mutantes de los exones VII y X se valoró por PCR-RFLP.

2. Estudio del exón IV

2.1 Amplificación por PCR, purificación y secuenciación del amplicón del exón IV

Las reacciones de amplificación del exón IV del gen de la acetilcolinesterasa se llevaron a cabo con los cebadores BoAce-518F y BoAce-1040R (Nardi *et al.* 2006) en un volumen final de 12.5 µL. Las mezclas de reacción incluyeron 0.64 µM de estos cebadores, 1.5 mM de MgSO₄, 1 µL de BSA (20%), 200 µM de cada uno de los dNTP, 0.2 unidades Vent® DNA polimerasa de alta fidelidad (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) y 10 ng de DNA molde de mosca del olivo.

El programa combinado de PCR constaba de 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 61°C y 30 segundos a 72°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C y 30 segundos a 94°C. Finalmente se incluyó un último paso de elongación a 72°C durante 3 minutos.

Los amplicones obtenidos, de unas 550 pb, se valoraron y cuantificaron mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa 2.5% con TBE teñidos con bromuro de etidio (1 µL/mL).

Los productos de PCR del exón IV se purificaron empleando 1 unidad de fosfatasa alcalina (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1u/µL) y 1.4 unidades de exonucleasa (Exonuclease I 20 u/µL) (Thermo Fisher Scientific, Inc. USA). Esta reacción enzimática incluyó un periodo de incubación de 30 minutos a 37°C seguido de 20 minutos a 80°C para desactivar las enzimas.

Una vez purificados, los amplicones se emplearon como molde en las reacciones de secuenciación en un secuenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Inc., USA) en el Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Los cebadores utilizados fueron los mismos que en las reacciones de PCR (BoAce-518F y BoAce-1040R).

2.2 Edición, alineamiento y análisis de secuencias del exón IV

Todos los electrofenogramas fueron revisados con Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd., Australia). Aquellos individuos cuyas secuencias presentaban picos dobles en la base correspondiente a la mutación que confiere resistencia a los insecticidas se asignaron como heterocigotos, mientras que los que no mostraron estos picos dobles se catalogaron como homocigotos. Con el fin de asegurar que las secuencias obtenidas no presentaban codones de fin inesperados, inserciones o deleciones (*indels*) se tradujeron a proteína, empleando el código genético universal incluido en el programa MEGA v5.05. (Kumar *et al.* 2011). El conjunto de secuencias obtenidas con cada uno de los cebadores se editó con el programa BioEdit v7.0.9.0 (Hall 1999) y se alineó con el algoritmo CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1997), que efectúa un alineamiento múltiple progresivo. Primero, se alinean las secuencias con mayor similitud y después se van añadiendo las demás al alineamiento. La longitud final del set de datos tras la edición fue de 521 pb.

Todas las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en las bases de datos del *GenBank*, empleando el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul *et al.* 1997) para corroborar que los fragmentos secuenciados correspondían al exón IV del gen *ace* de *Bactrocera oleae*.

Para confirmar que los individuos eran heterocigotos para esta mutación, sus secuencias se clonaron con el kit TOPO® TA Cloning® (Invitrogen, Inc. Reino Unido) en células competentes de la cepa DH5α de *Escherichia coli*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias transformadas se sometieron a reacciones de amplificación bajo las mismas condiciones que en el apartado 2.1, secuenciándose un mínimo de 5 clones por individuo con los cebadores BoAce-518F y BoAce-1040R.

Con las secuencias de los alelos identificados se elaboró una red de haplotipos, que quedan interconectados entre sí con el número de saltos mutacionales que los separan. Del mismo modo, se detectan secuencias consenso que se interpretan como haplotipos no muestreados, pero posiblemente existentes. La red de los alelos del exón IV del gen *ace* de *Bactrocera oleae* se generó con *Network* v4.6 (<http://www.flexus-engineering.com>).

Finalmente, las estimas de los parámetros de diversidad: diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y el número de sitios polimórficos (S) se realizaron con el programa DNAsp v4.50.3 (Rozas *et al.* 2008).

3. Estudio de los exones VII y X

3.1 Amplificación de los exones VII y X

En las reacciones de amplificación de los exones VII y X del gen de la acetilcolinesterasa se emplearon los cebadores, BoAce-1424 y BoAce-1519 (Nardi *et al.* 2006) y Boace10F y Boace10R (Kakani *et al.* 2013b) respectivamente. Sondas reacciones de PCR incluyeron 0.8 μM de los cebadores, 1.7 mM de MgCl₂ y 6.25 μL de Taq PCR Máster Mix 2X (Qiagen, Valencia, CA, EEUU) en un volumen final de 12.5 μL.

El programa de PCR para la amplificación de los fragmentos de los exones VII y X fue el mismo. Presentaba un paso de desnaturalización inicial del DNA a 94°C durante 3 minutos seguida de 38 pases de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 57 °C y 30 segundos a 72 °C. Tras el último ciclo, se incluyeron 3 minutos a 72 °C de elongación.

Los amplicones obtenidos se valoraron y cuantificaron mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa 2.5% con TBE teñidos con bromuro de etidio (1 μg / mL).

3.2 Digestión de los exones VII y X

La presencia de las mutaciones que confieren resistencia a insecticidas organofosforados situadas en exones VII y X se evaluó mediante la digestión de los amplicones obtenidos por PCR con enzimas de restricción.

Así, 100 ng del amplicón del exón VII fueron tratados con 7.5 unidades de la enzima de restricción *BssHII* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) en un volumen de 15 µL. La digestión se realizó incubando la muestra durante 3 horas a 50 °C seguido de un periodo de inactivación enzimática de 20 minutos a 60 °C.

En el caso del exón X se utilizaron 7.5 unidades de la enzima *MwoI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) para digerir 100 ng de producto de PCR también en un volumen final de 15 µL. En este caso, las incubaciones fueron de 2 horas a 60 °C y la inactivación enzimática se llevó a cabo mediante la incorporación de xileno.

En todas las incubaciones se incluyó como control negativo un DNA sin tratar con enzima. El resultado de las digestiones se resolvió en geles de agarosa al 4% teñidos con bromuro de etidio (1 µL/mL). Todas las muestras se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta Quantum ST5, Labtech y las imágenes se capturaron con una cámara acoplada a un sistema de captura y análisis de imágenes VisionCapt V16.08.

Puesto que se disponía de la información de los exones IV y VII en cada ejemplar, se reelaboró el set de secuencias empleado en el análisis del exón IV incorporando la información de los análisis PCR-RFLP del exón VII. Con esta nueva matriz de secuencias se trató de inferir la fase de ambos alelos, si se encontraban en acoplamiento o en repulsión en el cromosoma gracias a los algoritmos PHASE (Stephens *et al.* 2001; Stephens y Donnelly 2003), fastPHASE (Scheet y Stephens 2006) y HAPAR (Wang y Xu 2003) incluidos en el programa DNAsp v4.50.3.

Por último, con la aplicación web PhyloGeoViz v2.4.5. (Tsai 2011) se representó la distribución geográfica de los genotipos encontrados en los tres exones del gen *ace* en las poblaciones de *B. oleae*. Este software permitió visualizar la distribución espacial de los genotipos y su frecuencia en cada población mediante gráficos de sectores dispuestos sobre las coordenadas geográficas de las poblaciones muestreadas.

Resultados

1. Estudio del exón IV

Se ha analizado una secuencia de 521 pares de bases del exón IV del gen *ace* en un total de 216 individuos de la especie *Bactrocera oleae* procedentes de 23 poblaciones representativas de la cuenca del Mediterráneo, de los que 115 provienen de 12 muestras españolas (Tabla 1R). Se identificaron 10 sitios polimórficos o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), todos ellos localizados en la tercera base del codón a excepción del situado en la posición 122, que ocurre en la primera base del triplete. Mientras que los 9 SNP de la tercera base del exón IV del gen *ace* producían cambios silenciosos, el polimorfismo en la primera originaba el cambio del aminoácido Isoleucina por Valina en la enzima acetilcolinesterasa, que confiere resistencia a los insecticidas.

	73	88	122	259	274	316	406	412	415	484	Frec
A1	T	T	A	G	A	C	G	G	G	T	25%
A2	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	0.47%
A3	*	*	*	*	*	*	*	*	T	C	0.47%
A4	*	*	*	*	C	*	*	*	T	C	0.23%
A5	C	*	*	C	*	*	*	A	T	*	1.17%
A6	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	1.17%
A7	*	*	*	*	*	T	*	*	T	*	2.35%
A8	*	G	*	*	*	*	*	*	*	*	0.94%
A9	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.94%
A10	*	*	*	T	*	T	*	*	T	*	0.23%
A11	C	*	*	C	*	*	A	*	T	*	0.23%
A12	C	*	G	C	*	*	*	A	T	*	66.5%
A13	*	*	G	*	*	*	*	*	*	*	0.23%

Tabla 2R. Alelos detectados en las 23 poblaciones de *B. oleae* en las que se ha analizado el fragmento del exón IV. En la parte superior se señalan las posiciones polimórficas de la secuencia. La negrita indica la sustitución que da lugar al cambio del aminoácido Isoleucina por Valina relacionada con la resistencia a los insecticidas organofosforados. Frec. frecuencia del alelo en las muestras analizadas. Los dos alelos de mayor frecuencia se resaltan con el sombreado gris.

Estas variantes en la secuencia de DNA definieron trece alelos en el exón IV del gen *ace* (Tabla 2R), siendo A1 y A12, los detectados en España y los más frecuentes y extendidos a lo largo de toda el área Mediterránea, presentes en el 91% de la muestra analizada. El alelo A1, silvestre, tiene una frecuencia del 25% y se encontró en moscas procedentes de todos los países analizados. El A12, mostró una frecuencia del 66.5%, porta el polimorfismo que confiere resistencia los insecticidas organofosforados y se encontró en moscas procedentes de todos los países analizados excepto en Túnez.

Los once alelos restantes resultaron poco frecuentes siendo bien exclusivos de un único individuo, como A4 (Portugal) y A10 (Israel), o bien característicos de una población, como A8 (Túnez) y A9 (Israel). Todos ellos confieren sensibilidad a los insecticidas puesto que no se identificó la guanina en la posición 122. Además de en el alelo A12, sólo se encontró la mutación que confiere la resistencia en el alelo A13, exclusivo de un único individuo (Italia) y presente en heterocigosis.

La Figura 2R muestra una red con los 13 alelos del exón IV del gen *ace* detectados en las poblaciones mediterráneas de la mosca del olivo. Cada alelo está representado por un diagrama de sectores cuyo tamaño es proporcional al número de individuos que lo porta. Por colores se identificaron los países mediterráneos muestreados a excepción de la Península Ibérica, que engloba las poblaciones de España y Portugal. Como se observa en esta red, los 13 alelos están separados por un mínimo de 1 y un máximo de 6 pasos mutacionales. El alelo mayoritario A12, que confiere resistencia a los OP, estaba presente en todos los países muestreados excepto en Túnez. Este alelo A12 difiere en 5 SNP del segundo alelo más representativo, y portador de una variante sensible, el alelo A1, que está presente en todos los países caracterizados. El resto de alelos detectados en la cuenca mediterránea, todos ellos sensibles, a excepción de A13, se identificaron en pocos individuos. Las variantes A2 y A3 fueron características de la Península Ibérica y Túnez, mientras que A6 y A7 se encontraron en las poblaciones de Israel y Túnez. El alelo A5 se encontró tanto en moscas de Israel como en las de Túnez y Grecia. El resto de alelos - A4, A8, A9, A10, A11 y A13 - fueron exclusivos de las muestras de *B. oleae* de un país. En general, esta red de alelos no reflejó un claro patrón de distribución geográfico.

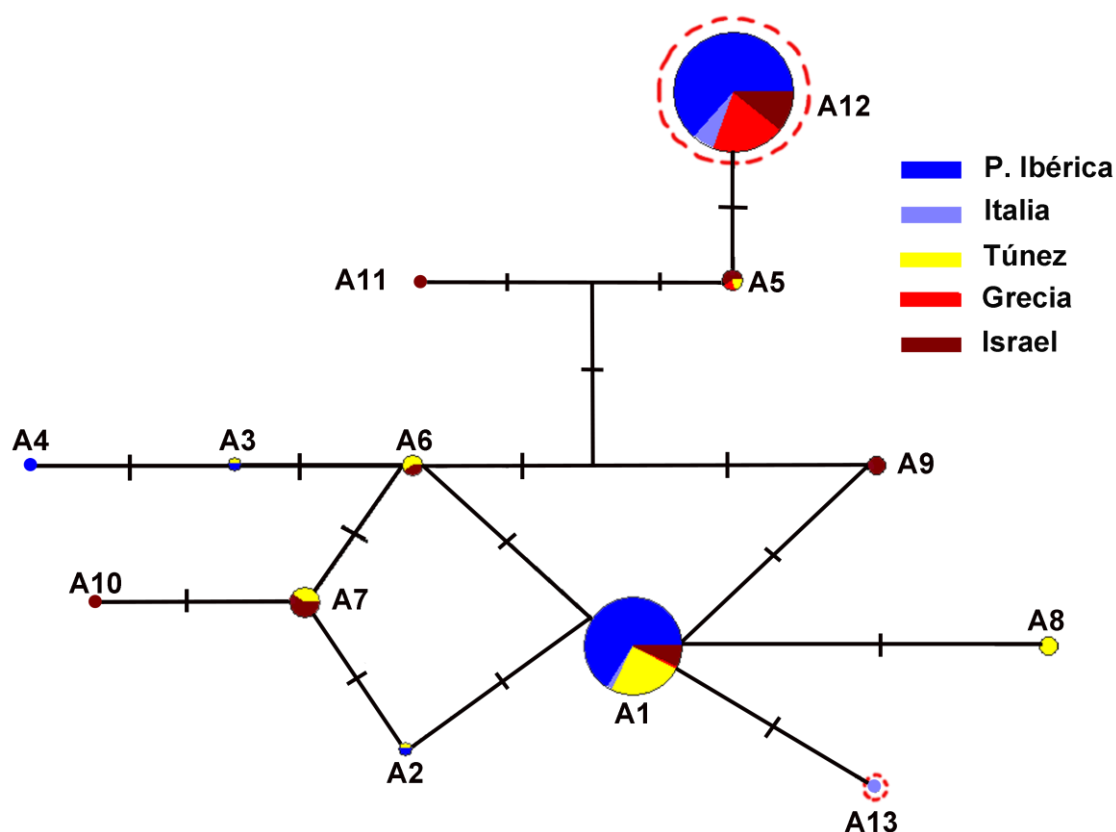


Figura 2R. Rede de los 13 alelos del exón IV del gen *ace* detectados en las poblaciones analizadas. Por colores se identifican los países en los que se han encontrado dichos alelos a excepción de la Península Ibérica, que engloba a España y Portugal. Las barras indican los pasos mutacionales que separan los distintos alelos. Las intersecciones representan alelos no muestreados. La línea discontinua roja indica los alelos que portan el polimorfismo que confiere resistencia a los OP.

Los parámetros de variabilidad de las secuencias del exón IV del gen *ace* en las moscas del olivo analizadas se muestran en la Tabla 3R. Las poblaciones se agruparon por países salvo las de la Península Ibérica que no incluye la de Baleares. En general, estos parámetros resultaron bajos en todas las muestras. En las poblaciones de *Bactrocera oleae* de Israel se detectaron los valores de mayor diversidad genética. En caso de la Península Ibérica, estas estimas obtuvieron unos niveles intermedios. Cabe destacar que la población de Baleares, con dos alelos, fue la que mostró los parámetros de diversidad genética más bajos, resaltando los valores de diversidad nucleotídica (0.0001) y el de diversidad haplotípica (0.09).

POP	<i>s</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>K</i>	π	N
P. Ibérica	7	4	0.350	1.749	0.0036	117
Baleares	1	2	0.090	0.090	0.0001	11
Italia	5	3	0.278	1.263	0.0024	10
Túnez	7	7	0.564	0.966	0.0018	20
Grecia	5	3	0.068	0.205	0.0004	29
Israel	7	8	0.663	2.498	0.0048	29
Total	10	13	0.495	2.254	0.0043	216

Tabla 3R. Medidas de variabilidad genética en el exón IV de las poblaciones de *Bactrocera oleae*. *s*, número de sitios polimórficos; *h*, número de haplotipos; *Hd*, diversidad haplotípica; *K*, número medio de nucleótidos diferentes; π , diversidad nucleotídica; N, número de individuos estudiados por población.

Atendiendo a la mutación puntual descrita en el exón IV del gen *ace* que confiere resistencia a los insecticidas organofosforados, el 88.5% de los individuos analizados de España presentaron el alelo (A12), bien en homocigosis o en heterocigosis y la frecuencia del alelo fue del 76.08%. El genotipo homocigoto sensible fue el menos común en España, con una presencia del 11.30%. Un 25.2% de los individuos estudiados eran heterocigotos para este polimorfismo que proporciona resistencia. El 63.4% de las moscas del olivo españolas presentaba el genotipo homocigoto resistente, siendo también el de mayor frecuencia en Italia y Grecia (Figura 4R).

Estos resultados muestran que la mutación I214V descrita en el exón IV del en *ace* de *B. oleae* tiene una elevada frecuencia en las poblaciones estudiadas y fundamentalmente en homocigosis. Está presente en todos los países del mediterráneo caracterizados a excepción de las muestras de Túnez y la muestra insular de Baleares.

2. Estudio de los exones VII y X

El estudio del exón VII se llevó a cabo mediante PCR – RFLP empleando la enzima de restricción *BssII*. El análisis del patrón de bandas obtenido permitió identificar a los individuos con genotipo homocigoto para la mutación (una banda), a los homocigotos de genotipo sensible (dos bandas) y a los heterocigotos (tres bandas) (Figura 3R).

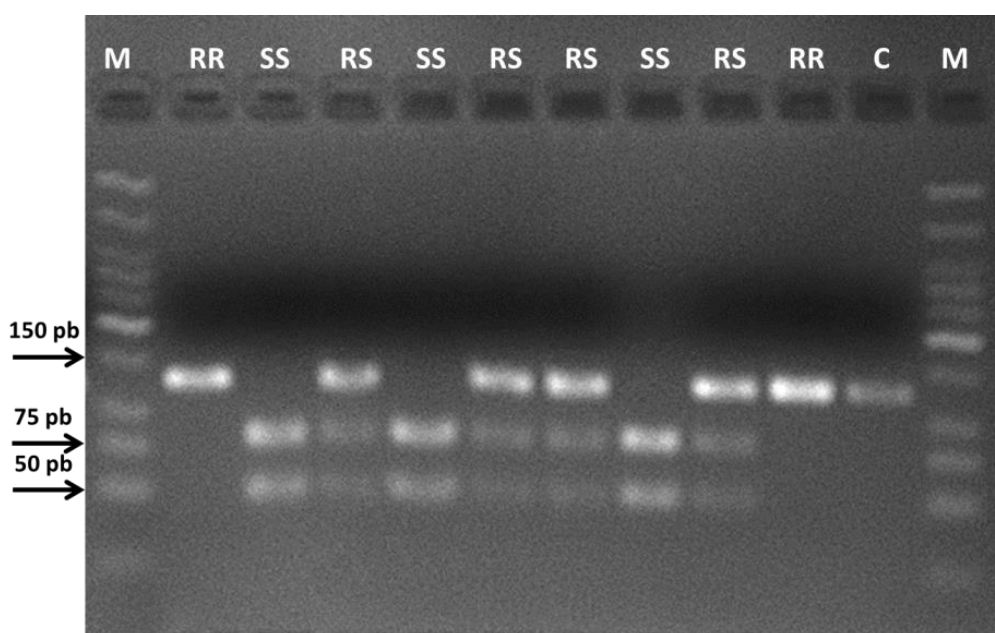


Figura 3R. Patrón de bandas obtenidas tras la digestión del amplicón del exón VII del gen *ace* con la enzima *BssII* en las moscas del olivo recogidas en Madrid. M, Marcador de peso molecular *Low Molecular Weight DNA Ladder*, *New England Biolabs* (Ipswich, MA, EEUU); RR, homocigoto para el polimorfismo que da resistencia; SS, homocigoto sensible; RS, heterocigoto; C, control negativo con DNA sin digerir.

Esta mutación puntual en el exón VII también tiene una presencia elevada en las moscas del olivo españolas (Figura 4R), pues se ha encontrado en el 87.7% de los individuos y la frecuencia del alelo resultó del 74.35%. La frecuencia de los individuos con genotipo homocigoto resistente fue del 60.8% y duplicaba a la de individuos con la mutación en heterocigosis (27%) mientras que la de individuos homocigotos sensibles fue de 12.1%. Esta mayor proporción de homocigotos para el alelo resistente también se observa en las muestras de Italia y Grecia.

Por tanto, el polimorfismo G488S que confiere resistencia a insecticidas organofosforados descrito en el exón VII del gen *ace* de *Bactrocera oleae*, se encontró a muy

elevada frecuencia, al igual que el polimorfismo en el exón IV que proporciona resistencia, estando presente en todas las muestras a excepción de Baleares, aunque en Túnez la presencia fue mínima (2.5%).

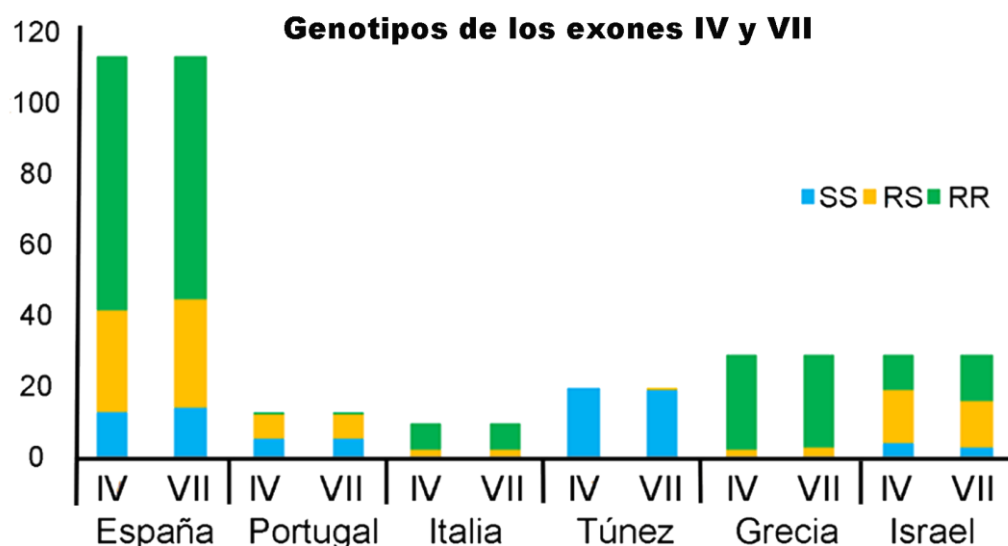


Figura 4R. Número de individuos identificados con los genotipos homocigoto sensible (SS), heterocigoto (RS) y homocigoto para la mutación que proporciona resistencia (RR) en los exones IV y VII en las poblaciones analizadas de *Bactrocera oleae* en el Mediterráneo.

Conocido el genotipo en los 216 individuos analizados respecto de los exones IV y VII del gen *ace*, se realizó un estudio conjunto de ambos loci (Figura 5R). Gracias a los algoritmos, citados en Material y Métodos, del programa DNAsp v4.50.3, en las moscas heterocigotas para ambos loci se pudo inferir la fase, es decir, si los alelos que confieren resistencia a insecticidas se encontraban en acoplamiento o repulsión

De nuevo, el genotipo de mayor frecuencia en España fue el doble homocigoto para las dos mutaciones I214V y G488S, detectado en 70 moscas, el 60.1% de la muestra. El doble homocigoto sensible se encontró en 13 individuos de los 115 analizados, el 11.3% de la muestra. El genotipo doble heterocigoto se observó en 29 moscas (25.21%), donde los dos polimorfismos que confieren resistencia a los OP se encontrarían en acoplamiento con una probabilidad superior al 95%. Estas tres combinaciones englobaron a casi el 97% de las moscas del olivo analizadas. En los 3 individuos restantes, al menos en uno de los exones, IV o VII, los alelos se encontraban en homocigosis observándose con mayor frecuencia homocigotos para la resistencia en el IV y heterocigotos en el VII (2 moscas) y homocigotos para la resistencia en el IV y homocigotos sensibles en el VII (1 individuos). Analizando conjuntamente los dos

exones en el área mediterránea la frecuencia del doble homocigoto con los polimorfismos que dan resistencia en IV-VII fue del 51.3% frente al 22.2% del homocigoto doble sensible.

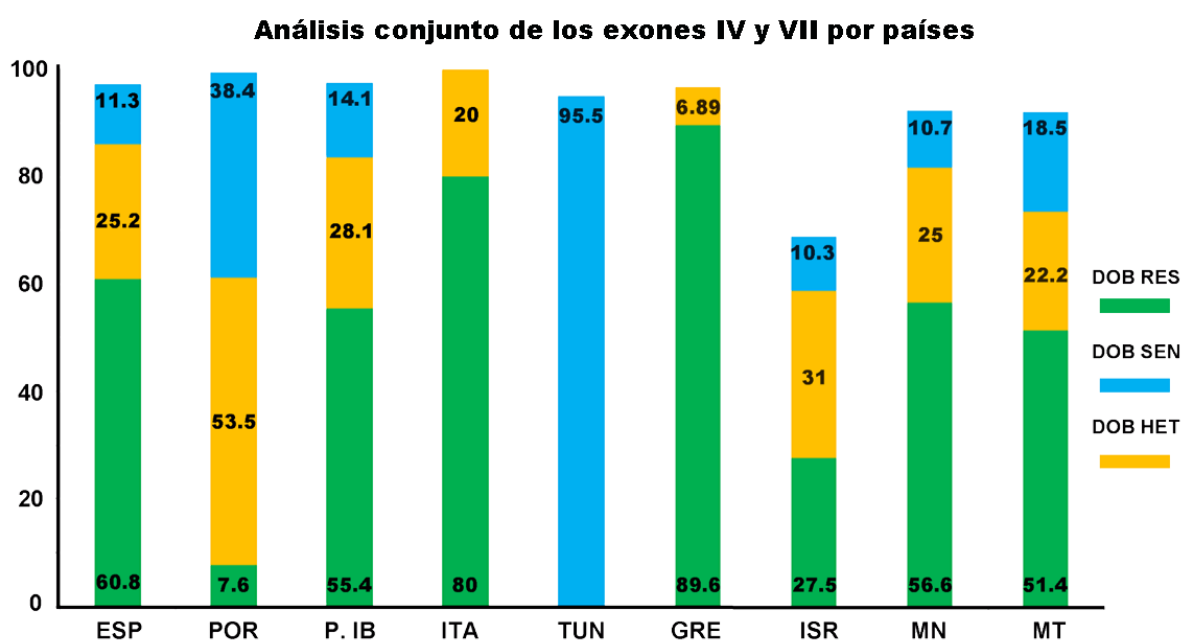
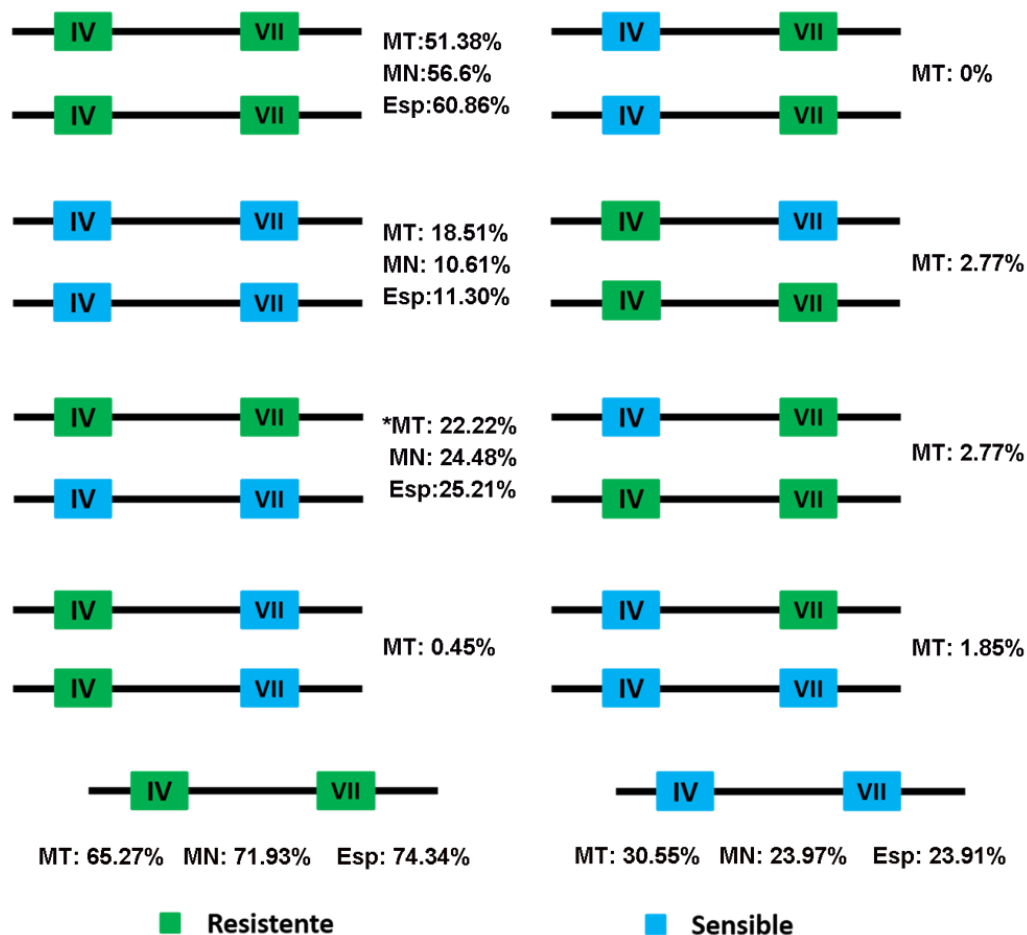


Figura 5R (página anterior). Gráfico superior: Análisis conjunto Exón IV –Exón VII, genotipos encontrados y sus frecuencias en España, NM norte del Mediterráneo (excluyendo Túnez), MT Mediterráneo en total. En verde se representa al alelo portador del polimorfismo que confiere ventaja frente a los OP; en azul el alelo sensible. *Disposición de los alelos en el doble heterocigoto con una probabilidad superior al 95%. Gráfico inferior: Análisis conjunto Exón IV – Exón VII con los tres genotipos mayoritarios encontrados y sus frecuencias por países y grupos de poblaciones.

El análisis del exón X también se llevó a cabo por PCR – RFLP. En este exón, la mutación que confiere resistencia a los OP no es un SNP sino una deleción de 9 pares de bases que ocasiona la pérdida de la diana de la endonucleasa de restricción *MwoI*. El análisis del patrón de bandas obtenido permitió identificar individuos homocigotos de genotipo sensible (dos bandas) y heterocigotos (tres bandas) (Figura 6R).

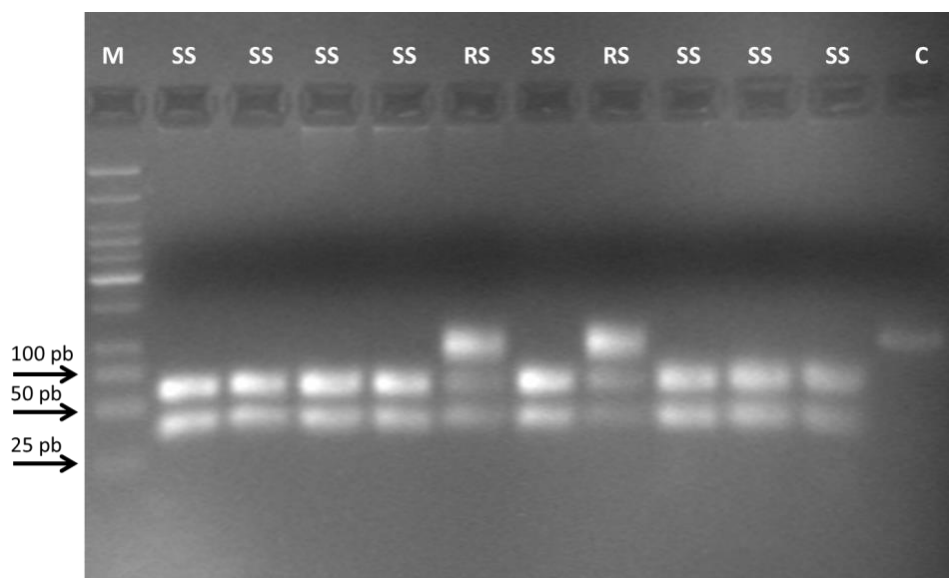


Figura 6R. Patrón de bandas obtenidas en los individuos de la población de Israel 2 tras la digestión del amplicón del exón X del gen *ace* con la enzima *MwoI*. M, Marcador de peso molecular *Low Molecular Weight DNA Ladder*, *New England Biolabs* (Ipswich, MA, EEUU); RS, SS, homocigoto sensible; heterocigoto; C, control de DNA sin digerir.

A diferencia de las mutaciones puntuales descritas en los exones IV y VII, la frecuencia de la deleción en el exón X en las poblaciones de *Bactrocera oleae* en cuenca mediterránea fue muy reducida y siempre en heterocigosis. En tan solo 11 de las 216 moscas del olivo genotipadas (el 2.5%) se identificó esta deleción, presente principalmente en individuos procedentes de una de las poblaciones de Grecia y de las tres de Israel. En España se ha

hallado en dos moscas (en las poblaciones de MAL y BAL). No se ha detectado en las moscas recogidas en Túnez e Italia.

Por último, mediante diagramas de sectores (Figura 7R), se ha representado en un mapa la frecuencia de homocigotos sensibles (azul), heterocigotos (amarillo) y homocigotos para el polimorfismo que da la resistencia (verde) detectados al analizar los tres exones del gen *ace* en cada una de las poblaciones muestreadas.

La frecuencia y distribución de las mutaciones en los exones IV y VII a lo largo del territorio de la Península Ibérica evidenció un gradiente de este a oeste. Las poblaciones más orientales como Tarragona, Teruel, Valencia y Málaga presentaron una mayor frecuencia de alelos resistentes, generalmente en homocigosis. Según se avanza hacia el oeste de la Península, la proporción de alelos sensibles aumenta, apreciándose por el incremento del número de individuos heterocigotos y homocigotos sensibles, tal y como ocurre en las poblaciones de Madrid, Cáceres o Badajoz. Las dos poblaciones más occidentales, ambas de Portugal, cierran este gradiente presentando una mayor frecuencia de moscas homocigotas sensibles y heterocigotos para los dos exones, superior a la de homocigotas resistentes.

Cabe resaltar, en las muestras de Baleares y Túnez la baja o nula frecuencia de los alelos que confieren resistencia a los insecticidas organofosforados en los tres exones. Por el contrario, las poblaciones de mosca del olivo procedentes de Grecia destacaron por la elevada frecuencia de homocigotos con los polimorfismos en los exones IV (93.1%) y VII (89,66%). En las muestras de Israel, la frecuencia de alelos resistentes presentes en heterocigosis fue de casi el 50%. Además, éste es el único país analizado en el que se ha encontrado la delección del exón X en una mayor proporción, también en heterocigosis, en 6 de las 29 moscas estudiadas.

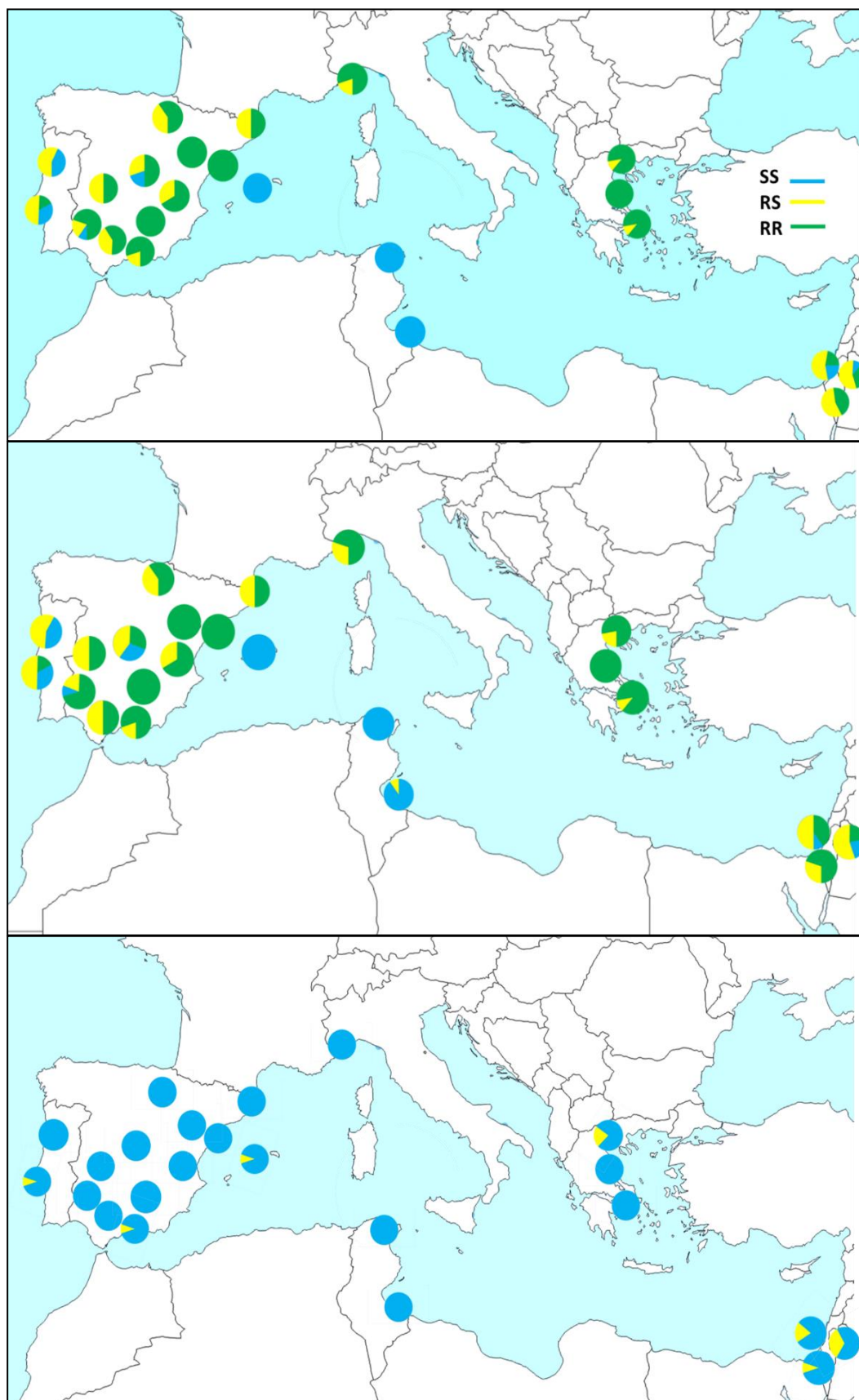


Figura 7R. Representación de la frecuencia y distribución de las mutaciones que confieren resistencia a los insecticidas organofosforados en los exones IV, VII y X en las poblaciones del área mediterránea analizadas.

Discusión

Con la introducción de los insecticidas químicos como el DDT o los OP durante la Segunda Guerra Mundial, el control de diferentes insectos vectores de enfermedades mejoró considerablemente (Sparks y Nauen 2014). El empleo de dichos químicos no se limitó al control de los vectores. La introducción de estos productos en los años 60 en la agronomía, durante la revolución verde, supuso una enorme mejora en la gestión de plagas, que, unido a los avances biotecnológicos en los cultivos, derivó en notables aumentos de producción (Pingali 2012).

No obstante, el uso de estos productos químicos durante los últimos 50 años también ha favorecido el incremento de poblaciones de plagas con resistencia a los mismos, habiéndose descrito resistencias a uno o varios pesticidas en más de 450 especies de artrópodos (Heckel 2012).

La diana de los insecticidas organofosforados es la enzima acetilcolinesterasa y las mutaciones puntuales en el gen que la codifica son el mecanismo de resistencia más común. En insectos este gen se encuentra duplicado presentando los loci *ace1* y *ace2* (Lee *et al.* 2014). Las moscas del suborden Cyclorrhapha han perdido una copia y presentan solo *ace2*, habiéndose descrito en él mutaciones que confieren resistencia a los OP en especies como *Drosophila melanogaster* (Mutero *et al.* 1994), *Musca doméstica* o *Bactrocera dorsalis* (Hsu *et al.* 2006). En el tefrítido *Ceratitis capitata*, una importante especie plaga de cultivos hortofrutícolas en España, que también presenta mutaciones puntuales en el gen *ace2* que incrementan su insensibilidad a OP, recientemente se ha descubierto una duplicación de dicho gen (Couso Ferrer 2012).

En cuanto a la especie que nos ocupa, *Bactrocera oleae*, se han descrito tres mutaciones en el locus *ace2* que confieren resistencia a los organofosforados, concretamente dos mutaciones puntuales en los exones IV y VII y una delección de 9 pares de bases en el exón X (Kakani *et al.* 2013a). Como en muchas otras especies, el control clásico de *B. oleae* se ha basado principalmente en la aplicación de insecticidas, cuyo éxito se ve comprometido por la presencia de estas mutaciones en las poblaciones naturales de dicha plaga y por el efecto perjudicial que los OP tienen sobre la artropodofauna beneficiosa del olivar. A pesar de la importancia del olivar en España, con más de 2.5 millones de hectáreas cultivadas y el principal productor y exportador de aceite y aceitunas del mundo, tan solo tres trabajos han analizado la presencia de resistencias en las poblaciones españolas de este tefrítido, principalmente en muestras de Andalucía (Hawkes *et al.* 2005; Kakani *et al.* 2013b; Pereira - Castro *et al.* 2015).

Por ese motivo, el objetivo de este capítulo ha sido el estudio de la frecuencia y distribución de las resistencias a OP presentes en los exones IV, VII y X del gen que codifica la enzima acetilcolinesterasa en moscas procedentes de doce poblaciones españolas y dos de Portugal. Asimismo, para tener una visión más amplia, se incluyeron 9 poblaciones de otros cuatro países del área mediterránea, Italia, Israel, Grecia y Túnez.

El estudio de la mutación puntual en el exón IV del gen *ace* de *Bactrocera oleae* se realizó por PCR y posterior secuenciación. El análisis de la secuencia de 521 pares de bases identificó trece alelos, de los que 3 están en moscas de España (A1 y A12 principalmente) y 5 cuando se engloba Portugal. De los trece alelos encontrados, once no portaban el polimorfismo que confiere la resistencia.

El alelo A1 con una frecuencia del 25%, es la variante sensible mayoritaria en el área estudiada y se distribuye a lo largo de la toda la cuenca mediterránea, detectándose en moscas de los seis países estudiados. Junto a este alelo A1 y a muy bajas frecuencias, se encontraron otras diez variantes también sensibles a insecticidas, que en total representan un 8.2% de las muestras. Los 9 polimorfismos que definieron estos 11 alelos silvestres, se localizaron siempre en la tercera base del codón, generando mutaciones silenciosas, como cabe esperar en el exón de un gen que codifica una enzima esencial para el correcto funcionamiento de la sinapsis neuronal. Estos polimorfismos son los responsables de la reducida variabilidad genética identificada en el exón IV del gen *ace* en las poblaciones mediterráneas de *B. oleae* (Tabla 3R).

En este estudio llama la atención la elevada frecuencia del alelo A12, del 76.08 en España y 74.74% en toda la región analizada, excluyendo las poblaciones africanas. Este alelo es portador del polimorfismo que confiere resistencia a los OP. Está ampliamente distribuido, identificándose en moscas del olivo de la Península Ibérica, Italia, Grecia e Israel. Esta variante resistente A12, difiere del alelo mayoritario sensible A1 en cinco SNP, siendo el de la posición 122, situado en la primera base del codón, responsable del cambio del aminoácido isoleucina por valina. Solo se ha identificado otra variante resistente A13, en un único individuo y en heterocigosis, su secuencia es idéntica a A1 salvo en la posición 122, que tiene polimorfismo que confiere la resistencia.

Tan solo hay dos trabajos que hayan analizado la secuencia del exón IV del gen *ace* en poblaciones de *B. oleae*. Nardi *et al.* (2006) secuenciaron dicho exón en 55 moscas del olivo del área Mediterránea e identificaron 18 alelos diferentes, si bien eran dos los más frecuentes, A (*resistente*) y C (*sensible*), que englobaban el 82.7% de las muestras. Pereira – Castro *et al.* (2015) encontraron 9 alelos en poblaciones de la Península Ibérica, principalmente

portuguesas, donde los alelos 1 (*sensible*) y 2 (*resistente*) englobaron el 96.12% de las moscas analizadas. Los alelos que hemos denominado A1 y A12 presentan la misma secuencia que los dos alelos mayoritarios descritos por ambos autores, pero la frecuencia a la que hemos identificado la variante que confiere resistencia a los OP del 76.08% - 71% en España - Península Ibérica, es superior a la estimada en estos estudios previos, 60% en el Mediterráneo (Nardi *et al.* 2006) y 62.9% en la Península Ibérica (Pereira-Castro *et al.* 2015)].

La presencia de este alelo a tan alta frecuencia en poblaciones naturales de la mosca del olivo pone de manifiesto la enorme presión de selección a la que se han visto sometidas estas poblaciones en las últimas décadas por el tratamiento con insecticidas. Generalmente, esta selección positiva va acompañada de un arrastre de polimorfismos neutros y una reducción de la variabilidad genética en la región genómica flanqueante al polimorfismo seleccionado (Galtier *et al.* 2000). La selección reciente del polimorfismo que proporciona resistencia a los OP y por tanto, la ventaja de los individuos que lo portan en las poblaciones naturales de *Bactrocera oleae* en la cuenca del Mediterráneo, se ve reflejada en el arrastre selectivo de cuatro polimorfismos neutros en las posiciones 73, 259, 412 y 415 de la secuencia del exón IV (Tabla 2R) y en la ausencia de diversidad genética en esta región genómica de los individuos que tienen la mutación en la posición 122 (Tabla 3R).

Esta marcada estructura haplotípica señala un origen único de esta mutación, todos los individuos con el polimorfismo en el sitio 122 presentaban la misma secuencia, el mismo alelo A12, a lo largo de la cuenca del Mediterráneo (Figura 2R y Figura 7R), que a su vez, es el mismo que el descrito por Nardi *et al.* (2006) y Pereira - Castro *et al.* (2015). Algunos autores han situado el posible origen de este alelo en regiones del mediterráneo oriental (Kakani *et al.* 2013b), fundamentalmente Grecia e Italia, basándose en la elevada frecuencia a la que encontraron, mediante análisis PCR-RFLP, esta mutación en ambos países. La frecuencia promedio a la que lo hemos detectado en España (76.08%) es algo inferior a la media estimada en Grecia (96.55%) o en la muestra de Italia (90%), pero superior a la estimada en el conjunto de las poblaciones de Israel (60.34%). No obstante, hay que tener en cuenta los diferentes tamaños muestrales analizados de cada país.

El alelo A12 difiere del alelo sensible A5 en un único nucleótido, el 122, que provoca el cambio de aminoácido que confiere la resistencia a insecticidas (Tabla 2R y Figura 2R). En este estudio filogeográfico se observa que dicho alelo A5 es característico de moscas del olivo de Grecia, Túnez e Israel y se ha descrito en moscas de Turquía (Nardi *et al.* 2006, alelo G). Ello podría señalar el posible origen del alelo A12 en el Mediterráneo oriental.

En cuanto al exón VII, se caracterizó por PCR- RFLP la presencia de la mutación puntual que también confiere resistencia a los organofosforados. El análisis arrojó unas frecuencias genotípicas prácticamente idénticas a las obtenidas en el exón IV. Más de la mitad de las moscas españolas analizadas presentaba la mutación puntual en homocigosis (60.8%). La frecuencia a la que se detectó el alelo que otorga resistencia a insecticidas ha sido del 74.35% en España y del 74.74% en la cuenca mediterránea si excluimos Túnez, estos valores son superiores a los encontrados por Hawkes *et al.* (2005) del 68.8% y Nardi *et al.* (2006) del 51.8%.

La elevada presencia a la que hemos detectado en nuestro trabajo la mutación pone de manifiesto, nuevamente, la enorme presión de selección a la que se han visto sometidas recientemente las poblaciones de *Bactrocera oleae*. Nuestros resultados se ven apoyados por el análisis de la secuencia de 94 nucleótidos de este exón VII que permitió identificar cinco alelos en el área mediterránea (Nardi *et al.* 2006) pero sólo uno de ellos confería resistencia a OP, cuya frecuencia, 51.8%, ya se ha indicado anteriormente.

El análisis conjunto de los dos exones reflejó que en España el 60.1% de las moscas analizadas fueron doble homocigotas para las mutaciones, en Italia del 80% y en Grecia de 89.6%, (Figuras 4R y 5R). Otros autores también observaron esta asociación en poblaciones naturales de mosca del olivo (Nardi *et al.* 2006; Kakani *et al.* 2013b; Pereira – Castro *et al.* 2015). El análisis conjunto también reflejó que, en los dobles heterocigotos, ambas mutaciones estarían en acoplamiento, con una probabilidad del 95%. La probabilidad de aparición de una nueva mutación puntual en un gen que ya porta un polimorfismo que confiere resistencia es inferior a que tenga lugar un evento de recombinación dentro del mismo (Mutero *et al.* 1994). En este contexto, lo más probable es que un evento de recombinación haya ligado las dos mutaciones de los exones IV y VII del gen *ace* que confieren resistencia a OP adquiridas de forma independiente.

El residuo de glicina en la posición 488 del exón VII del gen *ace* está conservado a lo largo de la filogenia y se cree que participa en el mantenimiento de la correcta topología del centro activo de la acetilcolinesterasa (Vontas *et al.* 2002). Vontas *et al.* (2001) evaluaron *in vitro* la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en líneas de laboratorio de mosca del olivo sensibles a insecticidas, en líneas homocigotas con la mutación en el exón VII y en líneas dobles homocigotas con las mutaciones en los exones IV y VII. Los resultados apuntaron que las moscas doble homocigotas para ambas mutaciones tenían una enzima 16 veces más insensible a los organofosforados que las moscas silvestres y mantenían la actividad catalítica

al 80% mientras que en las líneas de mosca del olivo homocigotas sólo para la mutación en el VII la actividad fue del 40%. Estos resultados en líneas de laboratorio llevaron a Hawkes *et al.* (2005) a plantear que la presencia de la mutación en el exón IV reduciría los efectos adversos causados por la mutación en el exón VII en la catálisis de acetilcolina. Por tanto, la capacidad de hidrólisis de la acetilcolinesterasa se vería restablecida cuando en el gen *ace* están presentes las dos mutaciones puntuales.

Es de esperar que en ausencia del insecticida las mutaciones que modifican la actividad enzimática impliquen un gran coste en la eficacia biológica del individuo que las porta. Por un lado, se dispone de una enzima menos susceptible de ser inhibida por el insecticida, pero por otro, la enzima resultante es menos eficiente para hidrolizar la acetilcolina, sustrato indispensable para la transmisión del impulso nervioso (Labbé *et al.* 2007). La alta frecuencia de aparición conjunta de las mutaciones de los exones IV y VII encontradas en éste y otros trabajos pone de manifiesto la ventaja que proporcionan frente al resto en este entorno olivarero tratado con pesticidas. No obstante, sería interesante determinar si también existen mecanismos genéticos subyacentes que ayuden a compensar la pérdida de actividad enzimática que implican estas mutaciones y la consecuente disminución en la eficacia biológica (Ffrench – Constant y Bass, 2017).

La presencia de resistencias a organofosforados en una especie plaga deriva en fumigaciones adicionales con diferentes químicos para mantener los niveles deseados de producción agrícola, lo que se traduce en una mayor presión de selección de las líneas resistentes (Pimentel 1996). A pesar de los intentos por controlar los niveles de fitosanitarios para la lucha frente a las plagas, la aparición de las resistencias implica fracaso del insecticida y constituye el principal obstáculo para la gestión efectiva de las mismas (Hsu *et al.* 2006).

Considerando la enorme importancia del sector olivarero en España, se caracterizó la frecuencia de estas mutaciones en 12 poblaciones de *Bactrocera oleae* y 2 de Portugal (Figura 8R). Como ya se ha expuesto, con una frecuencia de las variantes resistentes en los exones IV y VII del 76.08% y 74.34% en España y próxima al 71% englobando las dos muestras lusas, nuestros resultados superaron notablemente las estimas anteriormente obtenidas al analizar una muestra reducida de moscas del olivo de Andalucía, 27% y 33% (Hawkes *et al.* 2005) y Portugal, 0% (Nardi *et al.* 2006). Tan solo un trabajo más reciente que estudiaba una muestra más amplia de poblaciones de Portugal y que incluía cuatro poblaciones de Andalucía, reflejó una frecuencia de los alelos resistentes en IV y VII del 53% cada uno (Pereira - Castro *et al.* 2015). Es probable que la limitada muestra de las poblaciones españolas en estos trabajos

haya influido de forma directa en la estimación de unos niveles de resistencia a OP más bajos en las poblaciones de *B. oleae* de nuestro país.

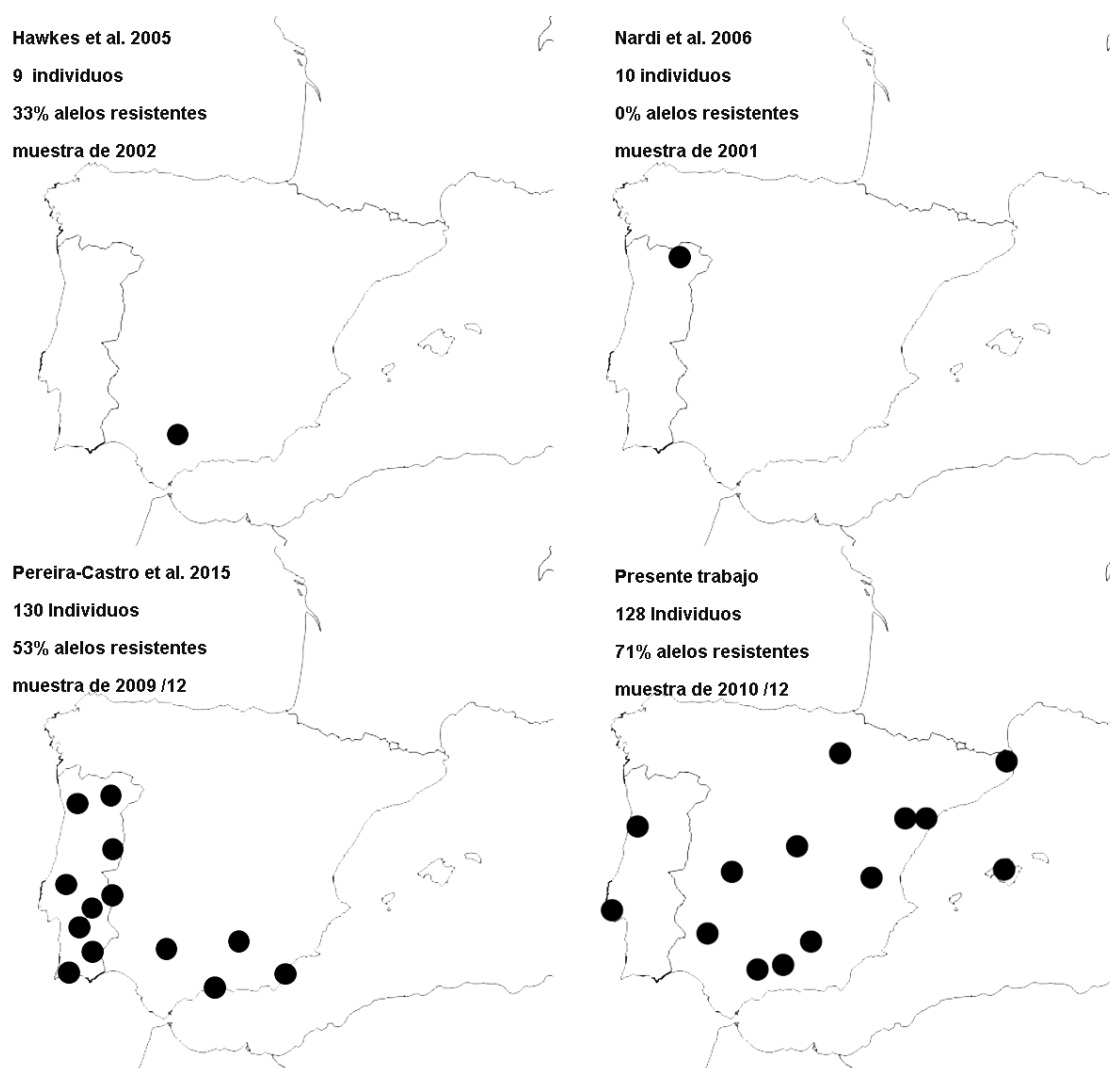


Figura 8R. Representación esquemática de los estudios sobre frecuencia de resistencia a insecticidas organofosforados en las poblaciones de la Península Ibérica. Se incluye la localización geográfica, el número de individuos, el porcentaje de alelos detectados que proporcionan resistencia y el año de toma de muestras.

La distribución de los polimorfismos que confieren resistencia a los OP no es homogénea a lo largo de la Península Ibérica. Al representar los genotipos de las moscas del olivo analizadas sobre las coordenadas geográficas de las poblaciones muestreadas, se observó una tendencia de este a oeste en cuanto a disminución de la frecuencia de los alelos resistentes (Figura 7R, exones IV y VII). Todas las moscas analizadas de Tarragona, Teruel o Jaén presentaban en homocigosis la mutación en los exones IV y VII que confieren resistencia a

los insecticidas. Poblaciones de *Bactrocera oleae* del centro como Madrid, Cáceres o Badajoz presentaban una mayor proporción de las variantes sensibles a insecticidas, en heterocigosis o en homocigosis. Por último, resaltar que, en las poblaciones portuguesas, las más occidentales, tan solo un individuo presentó en homocigosis las dos variantes que confieren resistencia, el resto bien fueron heterocigotas para ambas mutaciones o presentaban genotipo sensible.

La estrategia del sector oleícola portugués desde la segunda mitad del siglo pasado y hasta 1998 era la de sustituir los olivares por otros cultivos. No es hasta la reciente decisión de modernizar este cultivo, potenciar su conservación y optimizar las infraestructuras de producción cuando se han producido mejoras en el sector olivarero (ASAJA Jaén, 2017). La baja explotación del olivar en Portugal durante los últimos 50 años implicaba un uso mínimo de insecticidas organofosforados y, por tanto, habría una escasa presión de selección sobre estas poblaciones naturales de *B. oleae*. Esto podría explicar, en parte, la frecuencia reducida de resistencias a OP detectadas en Portugal y en regiones españolas cercanas como, Cáceres o Badajoz, donde el olivo no constituye el principal cultivo. Extremadura lidera, desde 1992, la producción ecológica agraria nacional como consecuencia de las condiciones climáticas favorables, la producción extensiva y la concienciación del sector agrario (Junta de Extremadura, Dirección general de Agricultura y Ganadería). En esta región, la extensión dedicada a la agricultura ecológica ha pasado de las 10000 ha (datos de 1996) a más de 80000 ha (datos de 2016), donde cerca del 35% de este cultivo es olivar, lo que conlleva un uso bastante limitado de productos químicos en los tratamientos frente a las plagas (Subdirección General de Calidad Diferenciada y Agricultura Ecológica, MAPAMA).

Por otro lado, cabe también destacar que todas las moscas del olivo procedentes de la muestra insular de Mallorca sólo tenían alelos silvestres en ambos exones. El análisis molecular de la secuencia del exón IV permitió identificar solo dos alelos diferentes, el alelo A1, con una frecuencia del 95% y el alelo A3. La ausencia de variabilidad genética podría ser consecuencia de un posible efecto de la deriva sobre las poblaciones de mosca del olivo dada la particularidad de este territorio de carácter insular.

Si atendemos a toda el área mediterránea del norte y este, las frecuencias de las variantes resistentes en los exones IV y VII fueron muy similares y próximas al 74%. Destacan las poblaciones de *B. oleae* de Grecia e Italia, donde la mayoría de los individuos son homocigotos para las dos mutaciones. Grecia e Italia dedican más de un millón de hectáreas al cultivo del olivo y tras nuestro país son los mayores productores de aceite y aceituna del mundo (FAO). Como consecuencia del impacto económico de las plagas del olivar es posible

que el control de las mismas se haya realizado de una forma poco regulada antes de la creación de la normativa europea 2009/128/CE. Tras la creación de los Planes Nacionales y del estricto control de los productos fitosanitarios, en Grecia están autorizados 27 productos diferentes (Ministerio de Desarrollo Rural y Alimentación de Grecia, decisión ministerial 8197/90920/22-7-2013) mientras que en España solo se autorizan 15 insecticidas. También se ha documentado que desde 2008 en Grecia se ha incrementado en un 25% el número de importaciones ilegales de productos químicos desde Turquía para el tratamiento de plagas como consecuencia de la crisis económica de la última década (<http://www.arc2020.eu>).

Nuestro estudio, es el primero que caracteriza de una forma representativa la presencia de alelos resistentes del gen *ace* en las poblaciones israelíes de mosca del olivo. Llama la atención la frecuencia de alelos sensibles detectada en Israel, cercana al 35%. Únicamente se dispone en la bibliografía de un estudio en el que se analizaron las mutaciones que confieren resistencia en los exones IV y VII en 10 adultos de *Bactrocera oleae* de esta región, y en ningún caso se identificó el alelo resistente A12 (Nardi *et al.* 2006). En cambio, sí se han descrito resistencias en poblaciones de *B. oleae* en Turquía, donde además estos alelos resistentes tienen una distribución desigual a lo largo de la geografía del país. La región Egea de Turquía concentra la mayor parte de la producción oleícola del país por lo que es posible que los tratamientos con fitosanitarios sean de mayor intensidad y frecuencia. Las poblaciones de mosca del olivo de esta área presentaron una frecuencia de alelos mutantes del 84%, mientras que las poblaciones mediterráneas (más próximas a Israel), tienen una menor actividad oleícola y la frecuencia de alelos que confieren resistencia fue del 45-50%. (Dogaç *et al.* 2014). En mayo de 2010, el gobierno de Israel publicó un plan estratégico de agricultura sostenible para promover la búsqueda de estrategias alternativas que permitiesen limitar los químicos de uso agrario sustituyéndolos por sustancias de menor impacto ambiental (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Israel, MoAg). Desde entonces, se ha fomentado el control biológico y autorizado el empleo de adultos esterilizados de mosca del olivo para reducir los niveles poblacionales de la plaga, destinando subvenciones para los agricultores que lleven a cabo estas aproximaciones (<http://www.israelagri.com>). Sería interesante evaluar en sucesivos muestreos el éxito de estas medidas tomadas por el MoAg en cuestión de agricultura ecológica y gestión de plagas encaminadas a frenar la presión de selección de alelos resistentes y a reducir el uso de organofosforados.

En definitiva, los primeros artículos que analizaron las mutaciones del gen *ace* que confieren resistencia a insecticidas organofosforados mostraban su presencia a muy elevada frecuencia en las poblaciones de mosca del olivo de regiones del centro-este Mediterráneo

como Italia o Grecia, siendo muy reducida o prácticamente nula su presencia en la Península Ibérica (Hawkes *et al.* 2005; Nardi *et al.* 2006). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo evidencian tanto la presencia de estos polimorfismos en España como su elevada frecuencia en todos los países del norte y este del área mediterránea (Figura 7R).

Por el contrario, en las dos muestras de mosca del olivo de Túnez prácticamente todos los individuos analizados presentaron los alelos sensibles a insecticidas en ambos exones. En este caso, sólo se ha detectado el polimorfismo que confiere resistencia en el exón VII en una mosca y en heterocigosis (2.5%). En ese entorno sí existe una presión de selección, puesto que en Túnez se emplean los compuestos organofosforados en el control de plagas, habiéndose descrito ya hace tiempo mutaciones en este mismo gen *ace* en el mosquito *Culex pipiens* (Cheikh *et al.* 1998) y en la mosca *Ceratitis capitata* (Elfekih *et al.* 2014). Es posible que estos alelos resistentes aún no se hayan expandido desde las poblaciones del norte Mediterráneo hacia el continente africano o bien se hayan introducido recientemente y se encuentren a tan baja frecuencia como para apenas ser detectados, como es el presente caso. Hasta donde sabemos, tan solo este trabajo ha caracterizado la posible presencia de las tres mutaciones descritas en el gen *ace* en muestras de *Bactrocera oleae* de Túnez. Esta práctica ausencia de alelos resistentes también se ha observado en poblaciones meridionales de mosca del olivo procedentes del continente africano, en concreto de Sudáfrica y Kenia (Hawkes *et al.* 2005; Nardi *et al.* 2006). Resultaría fundamental caracterizar más profundamente las poblaciones de esta plaga de países del norte del continente africano para un mayor conocimiento de la frecuencia y distribución de las resistencias a organofosforados en la cuenca mediterránea.

La elevada frecuencia observada en toda el área mediterránea de las dos mutaciones puntuales del gen *ace* contrasta con la baja presencia de la delección en el exón X. Nuestros resultados reflejaron una frecuencia de un 2.5% de dicha delección y siempre en heterocigosis (Figura 7R). Tan solo tres de los individuos muestreados en España y Portugal portaban la delección, dos en la Península Ibérica y uno en Baleares, un valor dentro del mismo rango, aunque ligeramente superior al aportado en estudios previos en los que, analizando una muestra de 60 moscas del olivo de España y Portugal, bien no se detecta (Pereira – Castro *et al.* 2015) o solo la porta un individuo (Kakani *et al.* 2013b). En cuanto a la frecuencia de la delección en las poblaciones de Israel y Grecia, ésta fue superior a la obtenida en las poblaciones peninsulares, del 10.3% y del 6.89% respectivamente y coincidentes con las publicadas en la bibliografía científica (Kakani *et al.* 2013b, 10% en Israel y 6.45% en Grecia). Así mismo, Dogaç *et al.* (2014) estimaron en las poblaciones mediterráneas turcas próximas a

Israel una frecuencia del 11.25% del alelo del exón X que confiere resistencia y del 3.09% en la región Egea.

Los resultados del presente estudio confirman una mayor incidencia de la mutación en el exón X del gen *ace* en las poblaciones de *Bactrocera oleae* del mediterráneo oriental. Es posible que esta mutación tenga su origen en estos territorios y se esté dispersando hacia otras áreas del mediterráneo, como también se planteó con el origen de la mutación puntual del exón IV y que su baja frecuencia se deba al coste biológico que supone para las moscas del olivo que la tienen.

El análisis conjunto de los tres exones del gen *ace* permitió apreciar que los individuos portadores de la delección en heterocigosis del exón X presentaban en homocigosis alelos sensibles en los exones IV y VII, excepto un individuo de la población Grecia 1 que presentaba un genotipo homocigoto para las mutaciones en los exones IV y VII y la delección del exón X en heterocigosis. La reducida frecuencia de la delección en el área mediterránea, nunca en homocigosis y su combinación con alelos sensibles a OP en los exones IV parecen indicar una menor eficacia biológica de los individuos que portan esta mutación y aún mucho más reducida en combinación con las mutaciones en los otros dos exones.

En el año 2011 Kakani *et al.* valoraron *in vitro* la actividad de la acetilcolinesterasa empleando líneas celulares que expresaban la enzima normal y líneas con la delección de 9 pares de bases ($\Delta 3Q$) en el exón X. A partir de los resultados obtenidos señalaron que estas moscas presentaban una mayor tolerancia al insecticida que las silvestres y concluyeron que esta mutación no afectaba al metabolismo de la acetilcolina dado que no modifica el centro activo de la enzima, a diferencia de las mutaciones puntuales que disminuyen la actividad catalítica entre un 20% y un 60% (Vontas *et al.* 2001).

Parece que la delección de 9 pares de bases en el extremo carboxilo terminal de la proteína mantiene a la enzima en la hendidura sináptica durante más tiempo, pues incrementa su afinidad por el fosfatidil inositol de las membranas celulares, al que se ancla la enzima (Figura 9R). Por tanto, los mutantes $\Delta 3Q$ presentarían un mayor número de moléculas de enzima ancladas a membrana, y en presencia del insecticida, parte de esas moléculas serán inhibidas, existiendo una fracción no bloqueada que podrá ejercer su acción de degradación de la acetilcolina (Kakani *et al.* 2008).

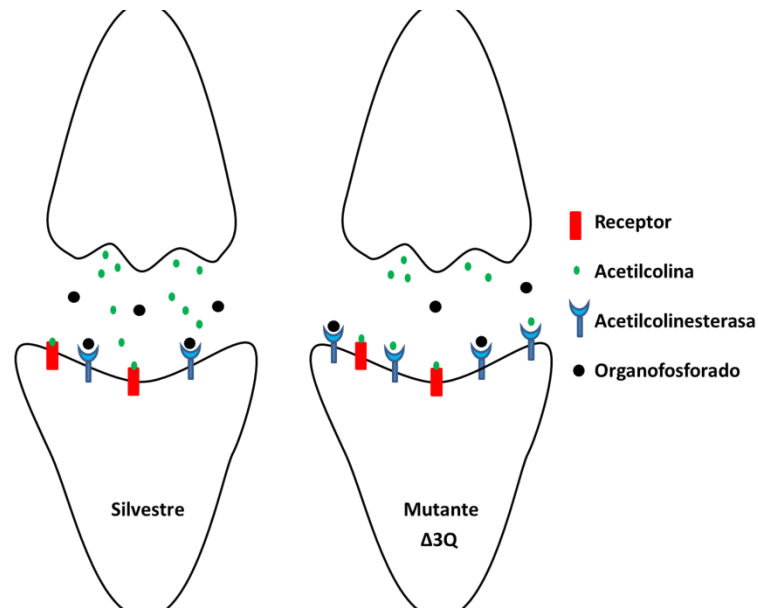


Figura 9R: Hendidura sináptica izquierda: representación del efecto de los insecticidas sobre los individuos de genotipo silvestre, donde el organofosforado compite con la acetilcolina por el centro activo de la acetilcolinesterasa. Derecha: representación de la acción de los insecticidas sobre los individuos con la delección en heterocigosis en el exón X del gen *ace*, con una mayor densidad de moléculas de acetilcolinesterasa. Basado en la ilustración de Kakani *et al.* (2011).

La modificación de la localización o de la capacidad de anclaje a membrana de la acetilcolinesterasa también se ha descrito en otros dípteros. A modo ilustrativo, en un trabajo sobre *D. melanogaster* y *M. domestica* (Kim y Lee 2013), se ha postulado la existencia de un mecanismo genético de procesamiento alternativo que elimina la zona de unión de la proteína a fosfatidil inositol de la membrana y esas enzimas solubles podrían ser la diana de los insecticidas sin que se vea dañada la sinapsis normal. Es posible que este mecanismo de modificación post transcripcional implique una mayor ventaja que la pérdida de un fragmento del gen *ace*.

En definitiva, los resultados del presente trabajo evidencian que las poblaciones de *B. oleae* del norte y este de la cuenca mediterránea presentan mutaciones puntuales en los exones IV y VII del gen que codifica la enzima acetilcolinesterasa que confieren resistencia a los insecticidas. Estas frecuencias resultaron muy altas en España 76.08% y 74.35%, respectivamente. El estudio detallado de las secuencias del exón IV pone de manifiesto una marcada estructura haplotípica en la región genómica que flanquea el polimorfismo responsable del cambio en la enzima, señala un origen común y una reciente y rápida

dispersión del alelo resistente A12 a lo largo del área caracterizada. Un 60% de las moscas del olivo españolas analizadas tienen las dos mutaciones en los exones IV y VII y ambas en homocigosis, que asciende al 80% y en la muestra de Italia y al 89.6% en Grecia; ello parece indicar una mayor ventaja adaptativa en este entorno olivarero. Por el contrario, la delección de 9 pares de bases en el exón X presentó una muy baja frecuencia y siempre en heterocigosis, poniendo de manifiesto el impacto sobre la eficacia biológica del individuo que la porta o su reciente origen en el este del mediterráneo donde es algo más frecuente.

Estas evidencias resultan de gran relevancia y de repercusión directa en el sector productivo olivarero, pues hoy en día todos los programas de control de la mosca del olivo incluyen el empleo de productos químicos en momentos de elevada densidad de la plaga. El control y la legislación de estos químicos es muy estricto, existiendo listados sobre los productos permitidos en cada cultivo (MAPAMA) y plataformas de alerta para poder fumigar en caso de predicción de un pico poblacional de *Bactrocera oleae* (RAIF, Red de Alerta e Información Fitosanitaria).

Teniendo en cuenta los niveles de resistencia a organofosforados identificados en las poblaciones de *B. oleae* en el área mediterránea, resulta fundamental encontrar alternativas efectivas que reduzcan de un modo notable la densidad de las poblaciones de la mosca del olivo. Los esfuerzos han de centrarse en la búsqueda de métodos biológicos, culturales, biotecnológicos o físicos que reduzcan el empleo de los químicos, destacando el desarrollo, puesta a punto y optimización de métodos de control biológico de las poblaciones de *B. oleae*, tal y como se plantea el Plan de Acción Nacional español (RD 1311/2012, BOE-A-2012-11605) y en la Guía Integrada de Plagas del olivar facilitados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Capítulo 3

Desarrollo y puesta a punto de una técnica de detección
molecular de la depredación de *B. oleae*

Introducción

El olivo y su producción tienen una gran relevancia en los países de la cuenca mediterránea. La Unión Europea (UE) produce el 69.6% del aceite de oliva y el 31.5% de la aceituna de mesa a nivel mundial (IOC, 2015). España, con una vasta extensión dedicada al cultivo olivarero, es el principal productor y exportador del mundo. La especie *Bactrocera oleae* constituye la plaga más destructiva de los olivares y genera grandes pérdidas económicas (Muñoz y García 2012), por lo que se impone una adecuada gestión de sus poblaciones.

Los métodos clásicos de control de esta plaga se han basado en el uso de productos insecticidas. El empleo de estos químicos tiene graves efectos sobre el medio ambiente, entre ellos la falta de especificidad, pues afectan a toda la artropodofauna. Como consecuencia de su uso desmedido, en los últimos años se ha visto un incremento de la frecuencia de alelos resistentes a estos insecticidas en *B. oleae* (Pereira-Castro *et al.* 2015).

En este escenario, en el año 2009 surge una Directiva Europea que establece el marco de acción comunitario para conseguir un empleo sostenible y una menor dependencia de los productos químicos (Directiva 2009/128/CE). En ella se insta a los Estados miembros a crear planes de acción nacionales en los que se fijen medidas, metas, calendarios e indicadores que permitan reducir los riesgos y efectos indeseados de los plaguicidas.

España aprobó en 2012 el Plan de Acción Nacional para el Uso Sostenible de Productos Fitosanitarios, donde una de las medidas más destacadas fue la elaboración de guías de Gestión Integrada de Plagas (GIP) (RD 1311/2012, BOE-A-2012-11605). A grandes rasgos, lo que contemplan las GIP es el control de las plagas, siempre que sea posible, con métodos biológicos, culturales, biotecnológicos o físicos antes que con cualquier método químico. En caso de control químico, se seleccionarán aquellos productos que proporcionen un control muy efectivo, es decir, que sean lo más selectivos posibles con la plaga y eviten el daño a las poblaciones de enemigos naturales, tanto flora como fauna (MAPAMA, Guía Integrada de Plagas del olivar, 2014).

Uno de los métodos de control solidarios con el medio ambiente que se propone, es el trampeo masivo de *B. oleae*. Para ello se colocan trampas coloreadas rellenas de sales de bicarbonato amónico disueltas en agua que tienen un potente efecto atrayente en los adultos y resulta adecuado para disminuir las poblaciones la mosca del olivo (Broumas *et al.* 2001). No obstante, en momentos de elevada densidad de mosca este método es poco eficaz (MAPAMA, Guía Integrada de Plagas del olivar, 2014).

Otra técnica interesante que se emplea es la de “árboles cebo”. Consiste en el tratamiento con productos químicos, atrayentes alimenticios o feromonas de *Bactrocera oleae* en varios de los árboles de los olivares. Dado que se trata sólo el 20-25% del olivar, se reduce notablemente el impacto medioambiental (Torres y Montiel 2007). A pesar de los beneficios de esta técnica para el ecosistema, la efectividad frente a la mosca del olivo depende de la densidad de la plaga.

En ocasiones, los productos naturales empleados en la agricultura ecológica resultan de utilidad en el control de los insectos. La espinosina es una molécula con un potente efecto larvicida descubierta en los años 80. Esta sustancia es producida por la bacteria *Saccharopolyspora spinosa* y tiene una eficacia similar a la de los insecticidas piretroides y superior a la de los organofosforados (Sparks *et al.* 2001). El uso del *Spinosad* (mezcla comercial de espinosinas) proporciona enormes beneficios frente a otros químicos tradicionales; no obstante, ya se han descrito en algunas especies de insectos mutaciones en los genes de las enzimas de detoxificación que confieren resistencia a estos productos (Sagri *et al.* 2014). Además, el spinosad tiene un efecto no deseado sobre las poblaciones de enemigos naturales de la mosca del olivo, principalmente sobre los artrópodos depredadores que habitan en la copa del árbol (Pascual *et al.* 2014).

El caolín es otro de los productos autorizados por la UE para el control de la mosca del olivo en el contexto de la agricultura ecológica. Se trata de un mineral de aluminosilicato que, aplicado sobre el árbol crea una película protectora que impide al insecto reconocer a su huésped y le genera repulsión (González- Núñez *et al.* 2014). Pero el caolín es una sustancia con efectos negativos sobre la comunidad de artrópodos del olivar, pudiendo alterar la densidad de parasitoides y depredadores que regulan tanto las poblaciones de mosca del olivo como las de otros fitófagos (Pascual *et al.* 2010).

Frente a estas sustancias, el control biológico mediado por enemigos naturales constituye, en la actualidad, una de las propuestas más interesantes de la GIP. El objetivo es reducir el número de individuos de *B. oleae* en los cultivos olivareros teniendo en cuenta los posibles enemigos naturales en cada fase del ciclo biológico de esta mosca (Picchi *et al.* 2016).

En este sentido, ya en 1998 el Departamento de Agricultura de California (CDFA, *California Department of Food and Agriculture*) estableció un programa de erradicación de *B. oleae* donde el control biológico era un pilar fundamental. Los esfuerzos de los investigadores se centraron en la búsqueda de enemigos naturales presentes en el ecosistema, principalmente parasitoides, y en la valoración de su eficacia frente a la plaga (Daane *et al.*

2011). Como los enemigos naturales presentes en los olivares californianos no resultaban efectivos para la supresión de las poblaciones de mosca del olivo, se importaron y caracterizaron parasitoides procedentes de las tres principales áreas de distribución geográfica de *Bactrocera oleae*: el área del Mediterráneo, África y Paquistán (Nardi *et al.* 2005). Varias de las especies del género *Psytalia* se propusieron para llevar a cabo el control de las poblaciones de esta mosca (Daane y Johnson 2010). *P. lonsburyi* se identificó como una especie de parasitoide específica de *B. oleae*, pero su efectividad frente a la plaga se ve reducida por los problemas de fecundidad y cría en el laboratorio (Daane *et al.* 2008). Las especies *P. concolor* y *P. humilis* también se propusieron por haber sido utilizadas con éxito frente a la plaga *Ceratitis capitata* en el área del Mediterráneo, pero ambas son generalistas, pudiendo atacar diferentes miembros de la familia Tephritidae, lo cual compromete la eficacia del control biológico (Wang *et al.* 2010). Además, se comprobó que los miembros del género *Psytalia* poseen un oviscapto de longitud reducida, que repercute negativamente en la tasa de parasitismo, siendo más eficaces sobre larvas de *B. oleae* presentes en la variedad silvestre del olivo, cuyas aceitunas son de menor tamaño (Wang *et al.* 2009). Por estos motivos, y a pesar del enorme esfuerzo realizado, los parasitoides resultan poco efectivos frente a la mosca del olivo, principalmente cuando ésta infesta las variedades cultivadas.

En el control biológico, la depredación mediada por enemigos naturales se contempla como una medida alternativa al empleo de parasitoides. Durante el otoño, la mayoría de las larvas abandona las aceitunas para pupar en el suelo, donde pasan el invierno enterradas. Teniendo en cuenta que los estadios de larva y pupa son los más vulnerables de ser depredados (Collier y Van Steenwyk 2003), durante los meses de otoño e invierno la actividad de la comunidad edáfica de artrópodos podría contribuir a la reducción de los niveles poblacionales de mosca del olivo (Picchi *et al.* 2016). No obstante, el paisaje olivarero resulta complejo y la fauna de su suelo varía según las condiciones ambientales y las prácticas agrícolas. Por ello, resulta primordial el estudio previo de la comunidad de artrópodos de un olivar (Picchi *et al.* 2016).

Los grupos Formicidae, Forficulidae, Araneae, Staphilinidae, Carabidae y Scolopendromorpha son considerados depredadores de amplia presencia en los olivares mediterráneos (Dinis *et al.* 2015), pero para valorar su potencial como enemigos naturales de *B. oleae* dentro de los olivares es fundamental realizar una clasificación según sus preferencias alimentarias y abundancia relativa (Gkisakis *et al.* 2016). La mayor parte de las clasificaciones de dichos artrópodos según su dieta se basan en observaciones directas. Sin embargo, la presencia de humanos en el agroecosistema puede alterar el comportamiento habitual de los

artrópodos en la red trófica (Rosenheim *et al.* 1999). Por ese motivo, aunque la caracterización de la comunidad de artrópodos del suelo del olivar ha experimentado importantes avances, aún no se ha podido confirmar la depredación sobre *Bactrocera oleae* por parte de estos grupos.

El estudio del contenido gástrico de los artrópodos constituye una buena aproximación para determinar las potenciales especies depredadoras de una plaga. El problema surge al tener en cuenta los hábitos alimenticios del artrópodo, pues o bien el tamaño de los restos encontrados en su tracto digestivo es ínfimo o en ocasiones consumen los fluidos internos de la presa, en ambos casos impidiendo la identificación final de las presas (Symondson 2002).

Ahí donde las técnicas de identificación basadas en caracteres morfológicos se ven limitadas, las herramientas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) resultan de gran utilidad para llevar a cabo esta identificación de las presas en el tracto digestivo de los depredadores (O'Rorke *et al.* 2012). Por tanto, el objetivo de este capítulo es el desarrollo y puesta a punto de una técnica sencilla y fiable que permita detectar el DNA de la mosca del olivo en el contenido digestivo de potenciales enemigos naturales presentes en el agroecosistema.

Un punto importante en los estudios de detección molecular *post mortem* de la depredación es la elección de una diana tal que permita la amplificación del DNA de la presa en el entorno del tracto digestivo, en condiciones de alta degradación y baja concentración.

En este contexto, el DNA mitocondrial (mtDNA) se postula como el candidato ideal para la elección de las secuencias diana. Se trata de un genoma con varias copias por orgánulo, y a su vez, numerosas mitocondrias por célula, lo que incrementa la probabilidad de éxito en la amplificación del DNA de la presa en el tracto digestivo de los depredadores (King *et al.* 2008). Esta molécula de DNA circular codifica un total de 37 genes entre los que se encuentra el gen de la enzima Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI). Entre sus características genéticas destaca la elevada tasa de sustitución nucleotídica de algunas de sus regiones, lo que le ha convertido en un marcador molecular empleado con frecuencia en estudios genéticos y en secuencia *barcode*, ampliamente utilizada durante los últimos años en la identificación molecular de especies animales (Herbert *et al.* 2003). Considerando las condiciones en las que se encontraría el DNA de *B. oleae* en el tubo digestivo de los depredadores, se seleccionó como diana el gen mitocondrial COI. El alto número de copias por célula y la elevada variabilidad interespecífica del mencionado gen favorecerán la detección del DNA de *B. oleae* aun estando degradado y a muy bajas concentraciones.

Por tanto, para llevar a cabo el presente trabajo, se diseñarán *in silico* cebadores en la región del gen COI que amplifiquen de forma específica DNA de mosca del olivo y evaluar los posibles depredadores recogidos en el campo. Ello aportará más conocimiento de la comunidad de artrópodos del olivar, permitirá determinar la contribución de los diferentes grupos taxonómicos a la depredación de la mosca del olivo, con el fin de favorecer el control integrado de esta plaga y disminuir la dependencia de productos químicos para su control tal y como recomienda la directiva comunitaria.

Material

Para el diseño *in silico* de los cebadores que permitan detectar DNA de *Bactrocera oleae* en el contenido digestivo de los potenciales depredadores, se emplearon secuencias del gen COI de *B. oleae*, de otros tefrítidos y de coleópteros característicos de la Península Ibérica frecuentes en los olivares del sur de la Comunidad de Madrid (Anexo 1).

Con el fin de testar la especificidad y sensibilidad de los cebadores diseñados, se empleó DNA de ejemplares de varias especies de tefrítidos, en concreto de *Bactrocera oleae* (Rossi 1790), *B. curcubitae* (Coquillett 1899), *B. dorsalis* (Hendel 1912), *Ceratitis capitata* (Wiedemann 1824), *C. rosa* (Karsch 1887), así como de *Drosophila melanogaster* (Meigen 1830). Estos ejemplares procedían de estudios previos de nuestro grupo de investigación. También se usó DNA de las especies de coleópteros *Pterostichus globosus* (Fabricius 1792), *Orthomus barbarus* (Djean 1828) y otros artrópodos del olivar como *Alopecosa cuneata* (Clerck 1757), *Forficula auricularia* (Linnaeus 1758) y *Tapinoma nigerrimum* (Nylander 1856). Tanto los carábidos como los restantes potenciales depredadores empleados en el estudio se recogieron bien instalando 4 trampas de gravedad secas por olivar expuestas durante 24 horas como bien a mano, en 14 olivares del sur de la Comunidad de Madrid (Figura 1D).

La determinación de los tiempos de detección del DNA de *B. oleae* en el aparato digestivo del depredador se realizó mediante ensayos de alimentación con 56 especímenes adultos del carábido *O. barbarus*, una de las especies más abundantes de los olivares del sudeste de la Comunidad de Madrid (Dra. Susana Pascual *com. pers.* Dpto. de Protección Vegetal, INIA). Los ejemplares fueron recogidos por las Dras. Susana Pascual y Marta Ortega (Dpto de Biodiversidad, Ecología y Evolución, Universidad Complutense de Madrid) e identificados por los Dres. Sonia A.P Santos (Dpto. de Entomología, Instituto Politécnico de Braganza) y Sergio Pérez-González (Dpto. Biodiversidad, Ecología y Evolución, Universidad Complutense de Madrid). Las pupas de mosca del olivo fueron proporcionadas por el NAIPC (*Nuclear Applications for Insect Pest Control*) de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) en Austria y se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

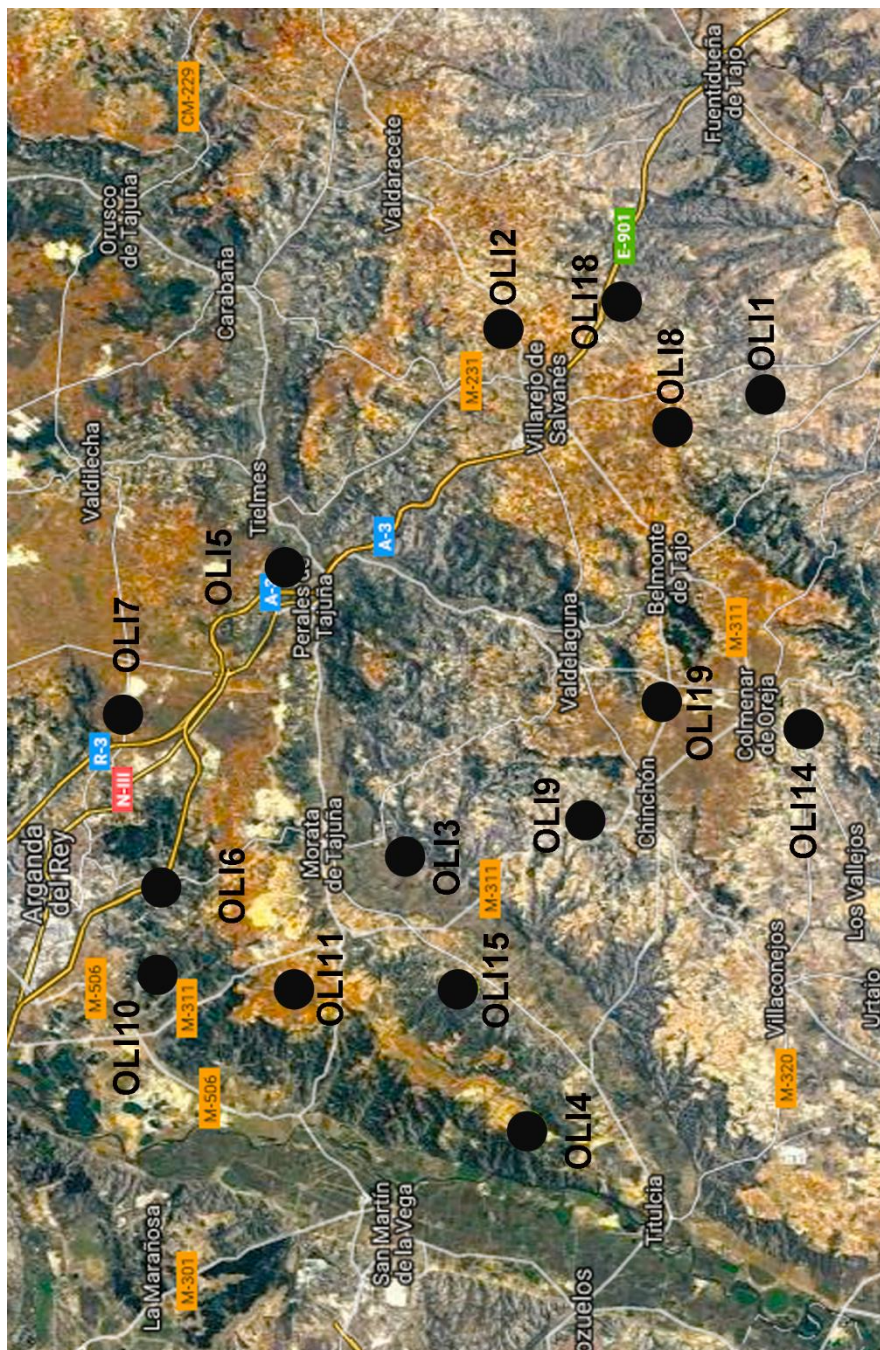


Figura 1D. Mapa del Sureste de la Comunidad de Madrid. Los puntos están situados sobre las coordenadas geográficas de cada uno de los 14 olivares muestreados en este estudio.

Métodos

1. Diseño de los cebadores

El estudio molecular *post mortem* de la depredación de *Bactrocera oleae* por artrópodos presentes en el olivar implicó, en primer lugar, el diseño de unos cebadores altamente específicos que solo amplifiquen de DNA de la mosca del olivo.

En el diseño *in silico* se emplearon las secuencias de los 57 haplotipos del gen COI de *B. oleae* encontrados de las poblaciones de la Península Ibérica y descritos en el estudio filogeográfico (Capítulo 1). Las secuencias del gen COI de las especies de tefritidos filogenéticamente próximos a *B. oleae*, así como las de las potenciales especies de carábidos depredadores más representativas de los olivares de la Península Ibérica, se obtuvieron de las bases de datos *Barcode of Life Database* (BOLD, <http://www.barcodeoflife.org>) y *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Anexo 1).

A continuación, se elaboró una matriz con estas 289 secuencias de COI empleando el programa BioEdit V.7.0.9.0 (Hall 1999) y ésta se alineó gracias a la herramienta *K-Alignment*, incluida dentro de *Multiple Sequence Alignment* (MSA), disponible en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI <http://www.ebi.ac.uk/>). El alineamiento permitió identificar aquellas regiones del gen que presentaban máxima divergencia interespecífica y mínima variabilidad intraespecífica en *B. oleae*. Se seleccionaron cinco de estas regiones que permitieron diseñar siete cebadores (Tabla 1D) que producirían amplicones con tamaños comprendidos entre las 81 pb y las 301 pb (Figura 2D). Estos cebadores se nombraron según la posición que ocupa su base en 5' en la secuencia completa del gen COI de la mosca del olivo tomada como referencia (GU108472, Nardi *et al.* 2010).

Nombre del cebador	Secuencia del cebador 5'-3'
166F	GTAAGTCTCACGCTTTCGTA
253F	TTAGGGGCACCAGATATG
334F	CAGCAGCATAGTGGAAAACG
440F	CACTCCATTTAGCAGGTATC
334R	CGTTTTCCACTATGCTGCTG
440R	GATACCTGCTAAATGGAGTG
635R	GTCGAAAAAGGAAGTATTCAGA

Tabla 1D. Nombre y secuencia de los cebadores diseñados para la amplificación de pequeños fragmentos del gen COI de *Bactrocera oleae*.

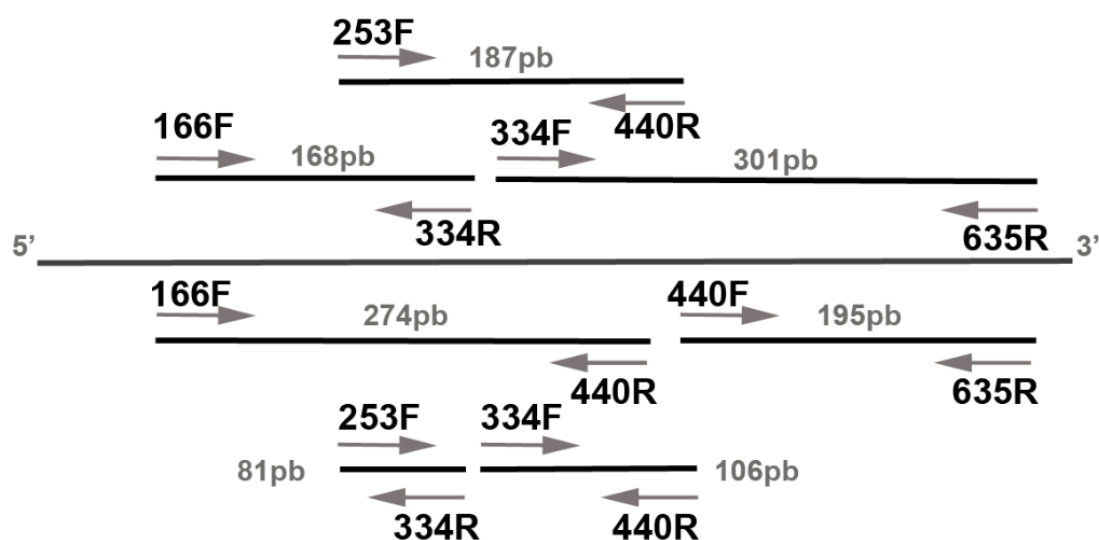


Figura 2D. Esquema del gen mitocondrial COI que muestra las combinaciones de cebadores diseñadas y el tamaño de los siete amplicones que se obtendrían en las reacciones de PCR.

2. Extracción del DNA

Para las extracciones de DNA se empleó el *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante, aunque con pequeñas modificaciones. Se incluyó un paso intermedio de incubación con RNAsa A a 37°C durante 30 minutos. Las eluciones del DNA se hicieron con tampón TE 10:1 (Tris-HCl 10mM pH 8 y EDTA 1mM pH 8) en un volumen final de 90 µL y se conservaron a -20°C hasta su posterior uso.

El DNA de los tefrítidos, de *D. melanogaster*, *A. cuneata*, *F. auricularia* y *T. nigerrimum* se extrajo empleando el ejemplar completo mientras que el DNA de los carábidos se extrajo a partir de su tracto digestivo. Para ello se procedió a su disección seccionando el extremo final del abdomen con un bisturí y tirando con suavidad del pronoto. Una vez retirado el intestino de la cavidad abdominal, se eliminaba la cabeza del ejemplar evitando perder el contenido del tracto digestivo (Figura 3D). En aquellos ejemplares que no pudieron ser eviscerados, se retiraron los élitros y la mayor parte de exoesqueleto para poder realizar la extracción. El material se esterilizó en etanol absoluto y mechero Bunsen y las placas eran reemplazadas por otras estériles cada vez que se cambiaba de ejemplar.

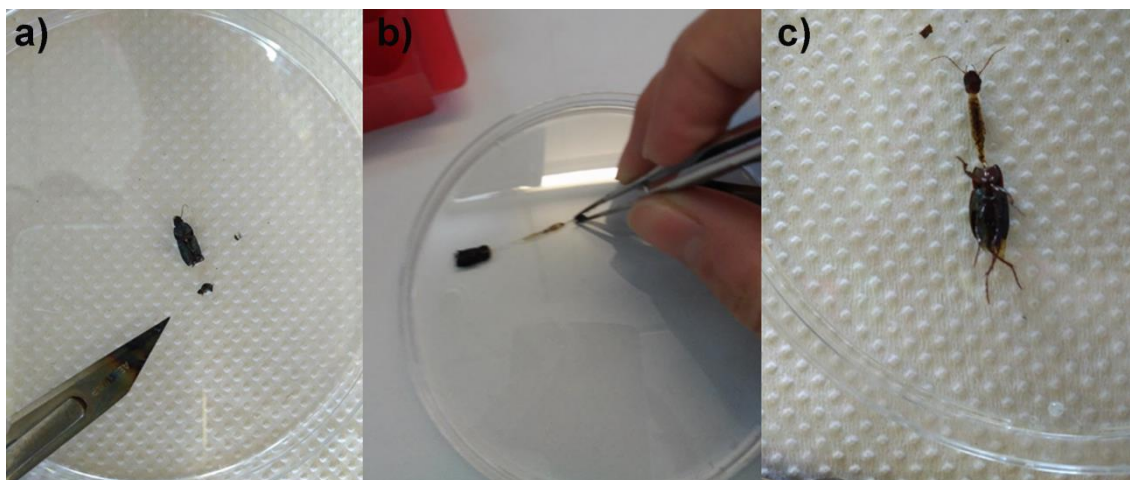


Figura 3D. Imágenes de las disecciones de los ejemplares de *O. barbarus*. a) corte del extremo final del abdomen del carábido; b) retirada del tracto digestivo tirando del pronoto con unas pinzas; c) ejemplar al que se le ha extraído el aparato digestivo de la cavidad abdominal.

La calidad de la extracción del DNA de todas las muestras se valoró en electroforesis con geles de agarosa al 0.8% en tampón TBE 0.5X (Tris-Borato 0.045 M, EDTA 0.001 M, pH8) teñidos con bromuro de etidio (1µg / mL). La concentración de los DNA se estimó mediante

espectrofotometría valorando la absorbancia a 260 nm con un NanoDrop®ND-100 (Nanodrop Technologies, Willmington, EEUU).

3. Desarrollo de la técnica de detección molecular *post mortem* de la depredación

3.1 Integridad del DNA extraído

En primer lugar, se efectuó un primer conjunto de PCR control con todos los DNA a emplear en el presente trabajo y utilizando los cebadores LCO 1490 y HCO 2198 (Folmer *et al.* 1994). Este procedimiento permitió descartar que la ausencia de amplificación en posteriores análisis sea consecuencia bien de la presencia de inhibidores de la PCR o bien de la baja integridad y reducida concentración del DNA extraído. Estas amplificaciones se desarrollaron en un volumen final de 10 µL con 1.5 mM de cada cebador, 2.3 µM de MgCl₂, 5 µL de *Master Mix* 2x (Qiagen) y 10 ng de DNA de cada uno de los ejemplares de las distintas especies empleadas en este estudio.

El programa de amplificación de estas PCR incluía un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C durante 45 segundos, un minuto a 60°C y un minuto a 72°C. La PCR concluía con un paso de elongación a 72°C durante 10 minutos. Los resultados de estas reacciones de amplificación se evaluaron mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa al 1% con TBE 0.5X (Tris-Borato 0.045 M, EDTA 0.001 M, pH8) teñidos con bromuro de etidio (1 µg / mL)

3.2 Especificidad y sensibilidad de los cebadores diseñados

A continuación, se determinó la especificidad de los cebadores diseñados realizando siete sets independientes de PCR empleando las siete combinaciones de cebadores de *Bactrocera oleae* (Tabla 1D y Figura 2D). Como molde de las reacciones se emplearon los DNA de los tefrítidos y de *D. melanogaster* así como el DNA de los posibles depredadores del agro-ecosistema *O. barbarus*, *P. globosus*, *T. nigerrimum*, *A. cuneata* y *F. auricularia*.

Asumiendo que, en condiciones reales, la proporción del DNA de *B. oleae* en el tubo digestivo respecto del DNA de depredador es muy baja, el siguiente paso fue determinar la sensibilidad de los cebadores diseñados. Para ello, se realizaron PCR con DNA de *B. oleae* diluido en DNA de *Orthomus barbarus* (1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000). Todas las PCR incluyeron un control positivo con DNA de *B. oleae* (5ng/µL) y dos controles negativos, uno de especie con DNA de *O. barbarus* (5ng/µL) y otro de PCR, con agua.

Estos dos conjuntos de reacciones de PCR (especificidad y sensibilidad) se llevaron a cabo en un volumen final de 12.5 μ L incluyendo 1.5 mM de cada cebador, 2.3 mM de $MgCl_2$, 6.25 μ L de Taq PCR Master Mix 2x (Qiagen) y 10 ng de DNA molde. El programa de amplificación incluía un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguido de un ciclo combinado de 10 pases a 94°C durante 45 segundos, un minuto a 63°C y un minuto a 72°C y después 25 ciclos a 94°C durante 45 segundos, un minuto a 56°C y un minuto a 72°C. La PCR concluía con una elongación final de 4 minutos a 72°C. Los resultados de estas reacciones de amplificación se evaluaron mediante electroforesis horizontales en geles de agarosa al 3% con TBE 0.5X (Tris-Borato 0.045 M, EDTA 0.001 M, pH8) teñidos con bromuro de etidio (1 μ g / mL).

3.3 Ensayos de alimentación

Tras comprobar la especificidad de los cebadores y la sensibilidad de los mismos en mezclas heteroespecíficas de DNA, los cebadores se testaron bajo condiciones reales de depredación. Para ello se emplearon 56 ejemplares del carábido *Orthomus barbarus* (Figura 4D).



Figura 4D: Ejemplares de la especie *O. barbarus*, utilizada en los ensayos de alimentación con pupas de *B. oleae*. Imagen tomada por Ignacio Juárez.

Los ejemplares de *O. barbarus* se mantuvieron en cámaras climáticas con unas condiciones de 21°C de temperatura, humedad relativa del 70% y un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas. Cada individuo permaneció en ayunas en una placa Petri individual durante dos

semanas hasta que se realizaron los experimentos. El agua se les suministraba en algodones humedecidos diariamente.

Este periodo de ayunas permitió la digestión de cualquier resto de presa que tuviesen en su tracto digestivo en el momento de la captura en el campo y, al mismo tiempo, ayudó a mantener a todos los ejemplares en un mismo nivel de motivación por hambre. Como presas se emplearon pupas congeladas de *Bactrocera oleae*, dado que es el estadio del ciclo biológico de la plaga con mayor probabilidad de ser depredado.

Transcurridas las dos semanas de ayuno, se congelaron 6 individuos a -20°C para utilizarlos como control negativo. Al resto se les proporcionó una pupa de *B. oleae* y se les permitió comer durante un máximo de 4 horas. El tiempo del ensayo *Oh* se fijó en el momento en el que la pupa se ingería completamente. Para poder estimar el éxito de la detección a lo largo del tiempo, los carábidos fueron congelados a 0, 2, 4, 8, 24, 36, 48 y 72 horas tras la ingesta de la pupa.

Las disecciones de los carábidos y las extracciones de DNA se realizaron tal y como se ha detallado en el apartado 2 de material y métodos. La calidad y la pureza de todas las muestras fueron valoradas por PCR con los cebadores universales LCO 1490 y HCO 2198 antes de realizar los ensayos moleculares con los cebadores específicos del gen COI de *B. oleae*.

3.4 Análisis molecular *post mortem* de la depredación en el laboratorio.

Todos los DNA extraídos del tubo digestivo de los escarabajos empleados en los ensayos de alimentación se sometieron a test de PCR con las siete combinaciones de cebadores de *B. oleae* diseñadas (Tabla 1D y Figura 2D). Tras evaluar el rendimiento de las amplificaciones mediante geles de agarosa al 3%, se seleccionaron aquellas dos combinaciones de cebadores capaces de detectar la depredación pasadas 72 horas desde la ingesta de la pupa (253F – 334R y 334F – 440R), para ser usadas en los ensayos posteriores.

Para confirmar la reproducibilidad de la detección del DNA de la presa a lo largo de los distintos tiempos post-ingesta, se realizaron tres PCR independientes usando estas dos parejas de cebadores seleccionadas.

4 Análisis moleculares *post mortem* de la depredación en campo

Finalmente, se valoró la eficacia de la técnica analizando el contenido gástrico de 94 artrópodos presentes en el agro-ecosistema olivarero, capturados en 14 olivares del sur de la Comunidad de Madrid (Figura 1D y Tabla 2D). Se realizaron dos muestreos, uno en primavera y otro en otoño, orientados al estudio del contenido gástrico de toda la artropodofauna del olivar.

	Trampas	A mano
Carabidae	30	18
Araneae	10	6
Dermaptera	1	15
Formicidae	12	2

Tabla 2D. Grupos taxonómicos de artrópodos edáficos recogidos en el olivar y el método de muestreo empleado.

Los individuos se congelaron al llegar al laboratorio y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior utilización. El DNA se extrajo a partir del tracto digestivo eviscerado de los carábidos (detallado en el apartado 2 de material y métodos) o a partir del ejemplar completo en el resto de artrópodos. Para descartar que la ausencia de amplificación de DNA de *Bactrocera oleae* fuera consecuencia de la mala calidad de la extracción o de la presencia de inhibidores en la PCR, primero se realizaron PCR control con los cebadores LCO 1490 y HCO 2198 (Folmer *et al.* 1994) al igual que en los ensayos anteriores.

Una vez descartadas estas dos posibilidades, se valoró la depredación sobre *B. oleae* empleando las dos parejas de cebadores específicos seleccionadas en los ensayos de depredación en laboratorio (253F – 334R y 334F – 440R) y por triplicado según las indicaciones del apartado 3.2 de material y métodos.

Resultados

1. Integridad del DNA extraído.

En primer lugar, se llevaron a cabo reacciones de PCR con todos los DNA extraídos empleando los cebadores universales del gen COI (Folmer *et al.* 1994). El análisis electroforético reveló la presencia de una banda en torno a las 700 pb en todas las reacciones (Figura 5D) descartándose la mala calidad de la muestra o la presencia de inhibidores de PCR que pudiesen enmascarar los resultados posteriores.

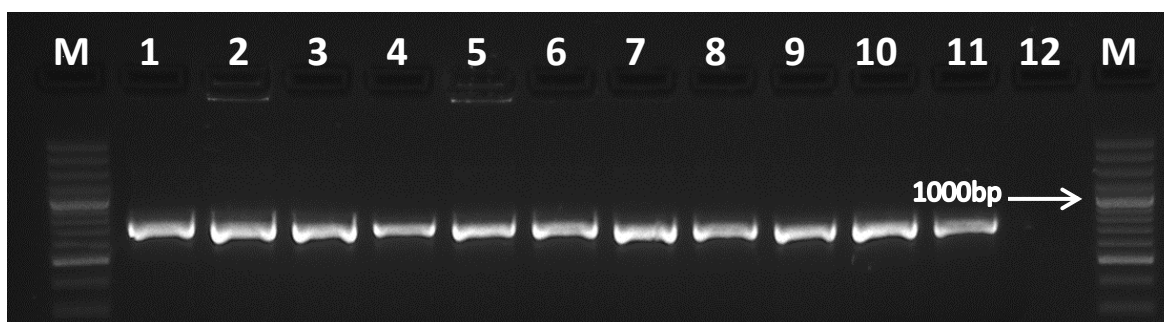


Figura 5D. Productos de PCR con los cebadores universales LCO 1490 y HCO 2198. Calles 1 – 11 amplicones obtenidos usando como molde 10ng de DNA de *B. oleae*, *B. dorsalis*, *B. curcubitae*, *C. capitata*, *C. rosa*, *D. melanogaster*, *O. barbarus*, *P. globosus*, *T. nigerrimum*, *A. cuneata* y *F. auricularia*; 12, control negativo de PCR; M, marcador de peso molecular *Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas).

2. Especificidad y sensibilidad de los cebadores diseñados.

Las siete parejas de cebadores diseñados para el análisis molecular *post mortem* de la depredación amplificaron de forma específica el DNA de *B. oleae*. No se obtuvo amplificación en aquellas reacciones que empleaban como molde el DNA de otros tefrítidos o artrópodos presentes en el agro-ecosistema del olivar. Por tanto, los cebadores resultaron altamente específicos generando fragmentos de tamaños comprendidos entre los 81 pb (253F – 334R) y los 301 pb (334F – 635R) (Figura 6D).

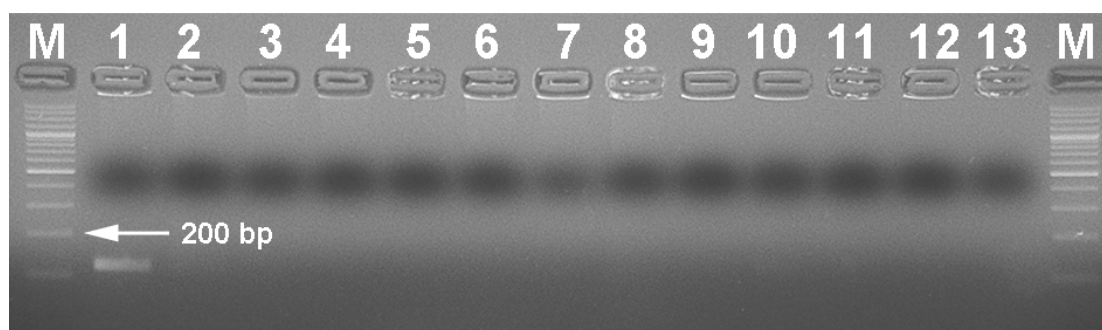


Figura 6D. Productos de PCR obtenidos con los cebadores 334F – 440R. M, marcador de peso molecular *Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas); calles 1 – 12 DNA de: 1, *B.oleae*; 2, *B. dorsalis*; 3, *B. curcubita*; 4, *C. capitata*; 5, *C. rosa*; 6, *D. melanogaster*; 7 y 8, *O. barbarus*, 9, *P. globosus*; 10 *F. auricularia*; 11, *T. nigerrimum*; 12, *A. cuneata*; 13 Control negativo de PCR.

En estos estudios moleculares *post mortem* de la depredación, la proporción de DNA del depredador respecto al DNA de la presa es muy elevada en el tracto digestivo del depredador, por lo que se evaluó la sensibilidad del set de cebadores diseñados. Se realizó un conjunto de PCR con todas las combinaciones de cebadores empleando como molde mezclas heteroespecíficas de DNA. Las diluciones realizadas partían de concentraciones 1: 1 (5ng / μ L de DNA de *Bactrocera oleae* en 5ng/ μ L de DNA de carábidos) hasta proporciones 1: 5000 (1 pg / μ L de DNA de *B. oleae* en 5 ng/ μ L de DNA de carábido). En todas estas mezclas heterogéneas se amplificó el DNA de *B. oleae*, incluso cuando estaba a muy bajas concentraciones (1pg / μ L), en comparación con el DNA del depredador (Figura 7D).

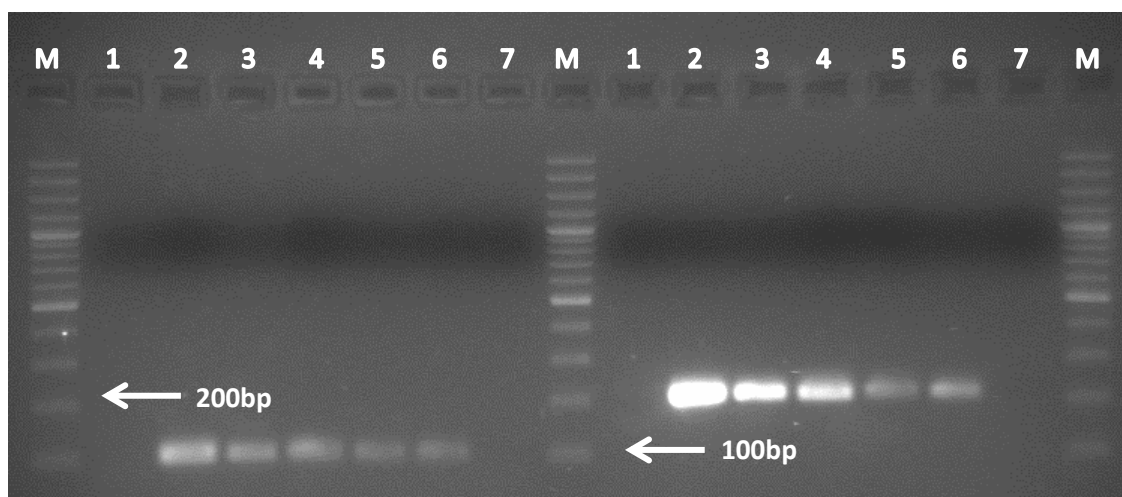


Figura 7D. Productos de PCR obtenidos con las combinaciones de cebadores 334F – 440R (izquierda) y 440F – 635R (derecha). M, marcador de peso molecular *Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas); 1, DNA de *O. barbarus* (10 ng) 2, DNA de *B. oleae* (10 ng); 3, dilución DNA de *B. oleae* en DNA de *O. barbarus* 1:1000; 4, dilución 1:2000; 5, dilución 1:4000; 6, dilución 1:5000; 7, control negativo de PCR.

3. Análisis moleculares *post mortem* de la depredación en laboratorio.

Comprobadas la especificidad y la sensibilidad de los cebadores, éstos fueron evaluados en condiciones reales de depredación. Para ello, se suministró una pupa de *Bactrocera oleae* a carábidos adultos de la especie *Orthomus barbarus* (Figura 4D) recogidos en los olivares del sureste de la Comunidad de Madrid, y mantenidos en cajas individuales en ayuno previo de 15 días. Tras consumir la pupa por completo, los escarabajos eran congelados a distintos tiempos entre 0 y 72 horas. Para cada uno de los tiempos comprendidos entre las 0 y las 36 horas se congelaron 6 carábidos, a las 48 horas 9 y a las 72 horas 8. Las extracciones de DNA realizadas a partir del tracto digestivo de estos escarabajos se usaron como molde en reacciones de PCR independientes empleando las 7 combinaciones de cebadores diseñados para este estudio.

El análisis de los fragmentos obtenidos reveló que todas las parejas amplificaban el DNA de *B. oleae* en condiciones reales de digestión (Tabla 3D y Figura 8D). Todas las combinaciones de cebadores amplificaron con éxito el DNA de la mosca del olivo en los escarabajos congelados transcurridas 8 horas post-ingesta de la pupa y en al menos 2/3 de los carábidos que habían sido congelados transcurridas 36 horas desde dicha ingesta. En el tubo digestivo de los carábidos congelados a las 48 horas, se observó que la combinación 253F – 334R era la más sensible de todas pues detectó el DNA de *B. oleae* casi el 90% de los individuos. En los carábidos congelados tres días después de la ingesta de la pupa, era posible detectar DNA de mosca del olivo con las parejas de cebadores que producían amplicones de menor tamaño, 253F – 334R (81 pb) y 334F – 440R (106 bp). De media, estas dos combinaciones de cebadores específicos detectaron el DNA de *B. oleae* en más del 85% de los 56 ejemplares de *O. barbarus* empleados en los ensayos de alimentación.

Combinación	Amplicón (bp)	T0	T2	T4	T8	T24	T36	T48	T72
253F-334R	81	100	100	100	100	100	100	87	37
334F-440R	106	100	100	100	100	100	66	62	25
166F-334R	168	100	100	100	100	100	66	22	0
253F-440R	187	100	100	100	83	83	66	22	0
440F-635R	195	100	100	100	100	66	66	33	0
166F-440R	274	100	100	100	100	66	66	22	0
334F-635R	301	100	100	100	100	100	66	22	0

Tabla 3D. Porcentaje de detección de DNA de *B. oleae* en el tracto digestivo de ejemplares de *O. barbarus* congelados a distintos tiempos tras la ingesta de una pupa. (bp), tamaño del amplicón en pares de bases; T0-T72, tiempo post-ingesta al que fueron congelados los carábidos. El área sombreada indica las parejas de cebadores seleccionadas para ensayos posteriores.

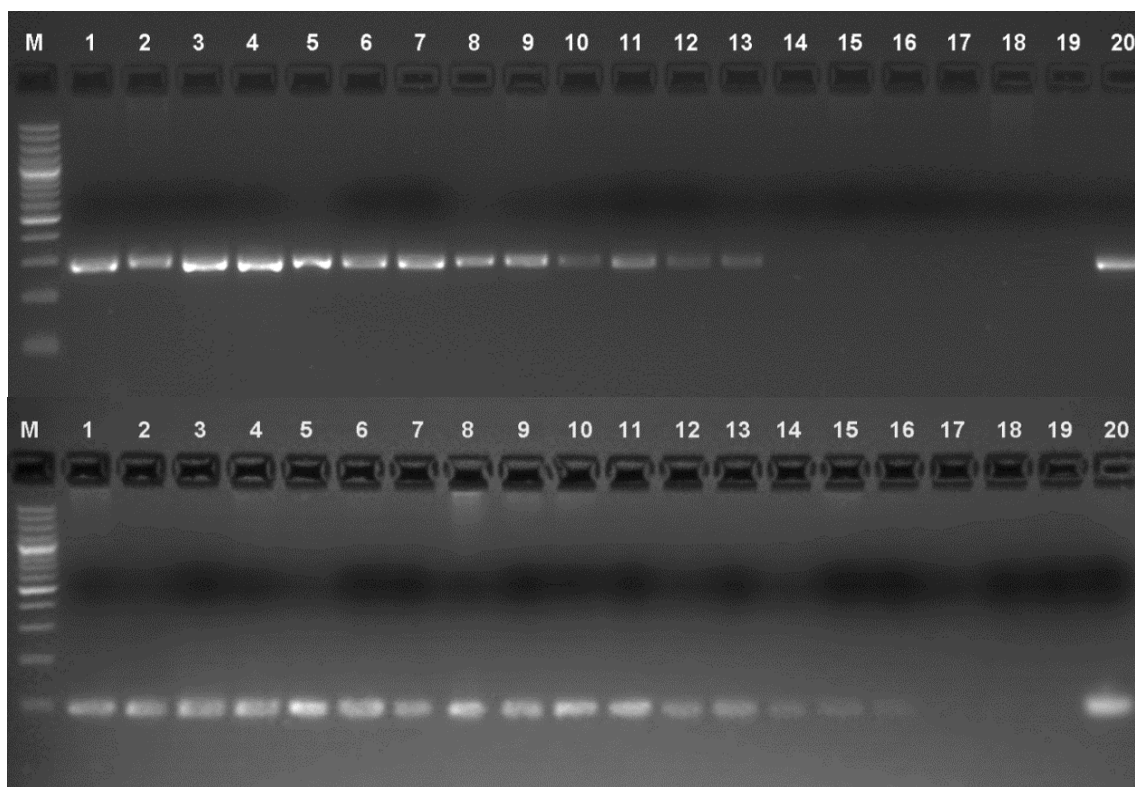


Figura 8D (página anterior): Productos de PCR obtenidos con los cebadores 166F – 440R (arriba) y 253F – 334R (abajo). M, marcador de escalera *Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas). Calles 1 - 16 resultados de las amplificaciones de tracto digestivo de carábidos congelados a distintos tiempos tras la ingesta de una pupa de *B. oleae*: 1 y 2, 0 horas; 3, y 4, 2 horas; 5 y 6, 4 horas; 7 y 8, 8 horas; 9 y 10, 24 horas; 11 y 12, 36 horas; 13 y 14, 48 horas; 15 y 16, 72 horas. Calles 17 y 18 controles negativos con DNA de *O. barbarus*; calle 19, control negativo de PCR; calle 20, control positivo con DNA de *B. oleae*

En vista de estos resultados, las parejas 253F – 334R y 334F – 440R, se consideraron como las más idóneas para el análisis del contenido digestivo de potenciales depredadores recogidos en el campo. Para completar la caracterización de estas dos combinaciones de cebadores, se llevaron a cabo tres reacciones de PCR independientes con cada una de las parejas usando como molde el DNA del tracto digestivo de los escarabajos empleados en los ensayos de alimentación. En estos triplicados, la combinación 253F – 334R fue capaz de detectar el DNA de la mosca del olivo en el 100% de las muestras transcurridas 36 horas, un resultado muy similar al obtenido para 334F – 440R, del 96.8%. La eficacia en la detección alcanzó el 70% para ambas parejas de cebadores después tras 48 horas desde la ingesta, y de casi del 50% tres días después de haber consumido la pupa.

4. Análisis moleculares *post mortem* de la depredación en campo.

Por último, se han analizado 94 ejemplares de artrópodos potenciales depredadores de *B. oleae* recogidos en olivares del sudeste de la Comunidad de Madrid pertenecientes a los siguientes 4 grupos taxonómicos: Araneae, Formicidae, Dermaptera y Carabidae.

Para este ensayo, se extrajo el DNA de todos los ejemplares capturados en el campo y se valoró la integridad de las muestras mediante PCR con los cebadores universales para el gen COI. Tras visualizar el resultado de las amplificaciones, se excluyeron 4 muestras. A continuación, se realizaron los análisis moleculares *post mortem* de la depredación con las dos parejas de cebadores específicos del COI de *Bactrocera oleae* seleccionadas en los ensayos de alimentación 235F – 334R y 334F – 440R (Tabla 4D).

Grupo	Nº individuos	Nº positivos en ingesta de <i>B. oleae</i>
Araneae	16	5
Dermaptera	16	5
Formicidae	14	2
Carabidae	44	6

Tabla 4D. Grupos taxonómicos de artrópodos recogidos en el campo, número de individuos analizados de cada grupo y número de individuos en los que una de las parejas de cebadores específicos amplificó DNA de *B. oleae*.

Las PCR se repitieron al menos dos veces con cada pareja de cebadores para descartar falsos negativos consecuencia de la ínfima concentración de DNA molde en la muestra. De los 90 individuos analizados, en 18 se pudo confirmar la ingesta de *B. oleae*, un 20 % de la muestra (Figura 9D). Por grupos taxonómicos, cabe destacar la depredación de *B. oleae* en el 31% de los arácnidos y dermápteros. Los carábidos, con un 13.6% mostraron la menor tasa de depredación.

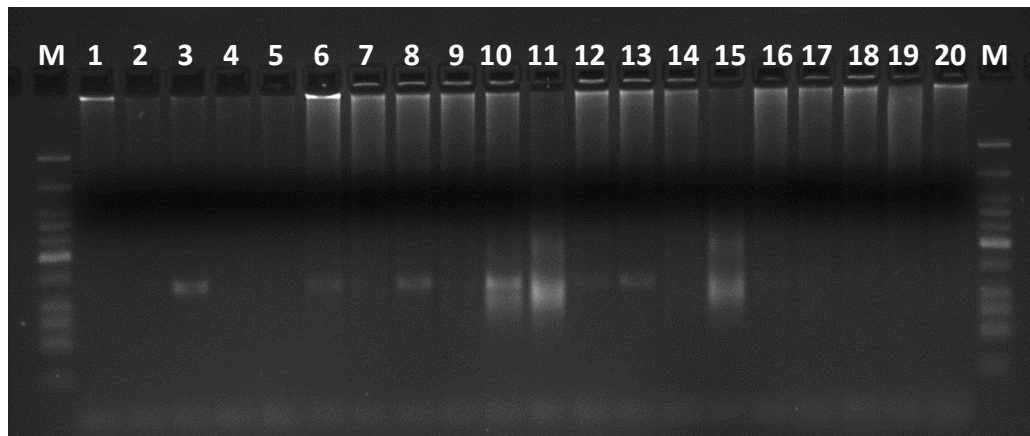


Figura 9D: Productos de PCR obtenidos con los cebadores 334F – 440R. M, marcador de escalera *Low molecular weight DNA Ladder* (New England Biolabs). Calles 1 - 20 artrópodos edáficos recogidos en los diferentes olivares de la Comunidad de Madrid en los que se valoró la depredación sobre *B. oleae*.

Discusión

Teniendo en cuenta las limitaciones de las medidas que se han empleado para minimizar a las poblaciones de la mosca del olivo, la gestión integrada de plagas (GIP) plantea un control de las mismas sostenible y menos nociva para el medioambiente. Una de las medidas emergentes de estos planes de control es la obtención de un beneficio ecosistémico gracias al empleo de los enemigos naturales de *Bactrocera oleae* presentes en los olivares. Para llevar a cabo un adecuado control biológico se impone valorar el potencial de cada grupo de artrópodos en cada fase del ciclo de la plaga.

El uso de los parasitoides es uno de los abordajes de control por enemigos naturales de esta plaga. Pero han mostrado una eficacia bastante reducida puesto que muchos de ellos son generalistas y también afectan a otras especies del ecosistema (Daane y Johnson 2010). En otros casos, el pequeño tamaño del oviscapto de las hembras del parasitoide hace casi imposible la puesta de huevos en las larvas de *B. oleae* que se encuentran en el interior de las aceitunas (Wang *et al.* 2011). En definitiva, la falta de especies de parasitoides específicos y las limitaciones a la hora de poder parasitar las larvas hacen que esta estrategia no resulte muy efectiva en el control de las poblaciones de esta plaga.

En la actualidad, una alternativa prometedora en el control biológico de *B. oleae* mediante enemigos naturales es el empleo de potenciales depredadores generalistas presentes en el agroecosistema (Dinis *et al.* 2015). Por un lado, los depredadores generalistas son capaces de alimentarse de un amplio espectro de presas y, por tanto, su supervivencia no se ve comprometida cuando las poblaciones de esta plaga disminuyen. Por otro, los diferentes grupos de depredadores permiten regular las poblaciones de la mosca del olivo en sus estadios más vulnerables, larva y pupa (Picchi *et al.* 2017). No obstante, determinar los enemigos naturales de una especie resulta un proceso complicado. Se trata de una compleja red trófica difícil de visualizar dado el tamaño del depredador y la presa. Así mismo, la presencia de observadores en el campo podría alterar el comportamiento habitual de las especies en esta red trófica (Rosenheim *et al.* 1999).

En este contexto, los análisis moleculares *post mortem* de la depredación resultan muy útiles para confirmar si, efectivamente, se ingiere o no *B. oleae*. Los primeros estudios moleculares se basaron en inmunoensayos con anticuerpos monoclonales (Symondson 2002). A pesar de la gran especificidad que implica este método, las proteínas frente a las que se diseñan los anticuerpos pueden degradarse con gran facilidad por las enzimas digestivas. Además, algunos epítomos son específicos de cada estadio del insecto, la elección de la diana y

la obtención del anticuerpo pueden llevar más de un año y la producción del mismo resulta económicamente costosa (Symondson *et al.* 2000). Por estos motivos, las técnicas moleculares basadas en el DNA han desbancado al uso de las proteínas en el estudio de las redes tróficas de los ecosistemas (Zaidi *et al.* 1999). La existencia de regiones del genoma altamente conservadas ha revolucionado el campo de la identificación de especies (Herbert *et al.* 2003) y con ello, ha generado una enorme cantidad de datos que permite el diseño de cebadores de DNA especie específicos que simplifiquen y abaraten la identificación de presas en el tracto digestivo de sus depredadores.

Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido la puesta a punto de la técnica de detección por PCR de DNA de *Bactrocera oleae* en el tracto digestivo de los artrópodos recogidos en el agroecosistema olivarero, con el fin de mejorar el conocimiento de las redes tróficas y poder seleccionar los candidatos adecuados para el control integrado de la mosca del olivo por depredación.

El diseño de los cebadores se centró en la región 5' del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I. Al ser un gen mitocondrial presenta un elevado número de copias por mitocondria y por célula, incrementando las probabilidades de detección del DNA de presa en condiciones en las que la cantidad de DNA de *B. oleae* es ínfima (Sint *et al.* 2011). Esta región 5' del genoma presenta una considerable variabilidad que permite distinguir especies próximas (Herbert *et al.* 2003), de tal manera que el diseño *in silico* de los cebadores se realizó en fragmentos de máxima variabilidad interespecífica y mínima intraespecífica. Además, los cebadores se diseñaron para amplificar fragmentos de pequeño tamaño, pues las enzimas digestivas del depredador degradan el DNA de la presa comprometiendo la probabilidad de detección a lo largo del tiempo (Brown *et al.* 2014; MacDonald *et al.* 2014).

Se identificaron 5 regiones óptimas para el diseño de 7 cebadores cuyas combinaciones amplificaron con éxito siete fragmentos de un tamaño comprendido entre 81 y 301 pb (Figura 6D), amplicones en el rango de otros estudios de depredación por carábidos sobre diferentes lombrices, ácaros y moluscos, donde oscilaron entre las 78 y las 242 bp (Harper *et al.* 2005), de un tamaño muy similar a los generados en la detección de DNA de pulgón de la soja *Aphis glycines*, (160-281 bp [Harwood *et al.* 2007]) o de distintos dípteros y colémbolos (101-274 bp [King *et al.* 2010]). Tan solo son dos los estudios realizados en otra plaga de tefrítidos, de detección molecular de la depredación sobre *Ceratitis capitata* mediada por carábidos y arañas y el tamaño de los fragmentos fue de entre 130-330 bp (Monzó *et al.* 2010) y 150-345 bp (Moreno-Ripoll *et al.* 2012).

Nuestras siete combinaciones reflejaron una enorme especificidad. Sólo se produjo amplificación en las muestras cuyo DNA correspondía a *Bactrocera oleae* y en ningún caso empleando como molde el DNA de tefrítidos filogenéticamente próximos a la mosca del olivo o de otros artrópodos característicos del olivar (Figura 6D). Esto resulta un requisito indispensable en los estudios moleculares *post mortem* de la depredación.

Igualmente, los cebadores reflejaron una gran sensibilidad al emplear como molde mezclas heteroespecíficas de DNA, incluso si el DNA de mosca del olivo se encontraba muy diluido en DNA del depredador *Orthomus. barbarus*. Todos ellos amplificaban el DNA de *B. oleae* aun cuando la concentración era de 1pg / μ L, es decir, cuando se tenía en PCR 2 pg de mosca del olivo como DNA molde (Figura 7D). Hasta donde sabemos, hay pocos trabajos en la bibliografía en los que se estimen los límites de sensibilidad con los que poder comparar resultados, pero nuestros valores superan el límite de detección obtenido en un trabajo similar con cigarras y cebadores diseñados frente a la región 5' del gen COI (6 pg / μ L; de León *et al.* 2006) e igualan al obtenido con el díptero *Haplodiplosis marginata* (von Roser), amplificando nuevamente el DNA mitocondrial (Rowley *et al.* 2017). En definitiva, los ensayos de especificidad y sensibilidad revelaron la idoneidad de los cebadores diseñados para estudiar la depredación de *B. oleae* bajo condiciones controladas de laboratorio.

Para testar estas herramientas en condiciones reales de digestión se empleó la especie de carábido *O. barbarus* (Figura 4D). La elección de un carábido para desarrollar ensayos de alimentación guarda relación con su abundancia en la comunidad edáfica del agro-ecosistema olivarero de Madrid durante los meses de otoño e invierno (Dra. Susana Pascual. *com. pers.*). Para esta primera aproximación se descartaron las arañas pues, a pesar de su relativa abundancia y elevada eficacia depredadora, se trata de un grupo cazador de larvas y moscas adultas, no habiendo referencias sobre el consumo de pupas (Dinis *et al.* 2015). Considerando que la detección del DNA de la presa en el digestivo del depredador puede variar enormemente en función de los hábitos alimenticios del artrópodo y del número de presas ingeridas (King *et al.* 2008; Gagnon *et al.* 2011), los tiempos del ensayo se establecieron de acuerdo con otros trabajos en los que se empleaban otras especies de carábidos (Harper *et al.* 2005; King *et al.* 2010; Monzó *et al.* 2011).

Los ensayos de alimentación pusieron de manifiesto la eficacia de todas las combinaciones de cebadores al amplificar DNA de *B. oleae* comprendidos entre las 0 y las 72 horas tras la ingesta de la pupa (Tabla 8D). En general, el porcentaje de detección de DNA de mosca del olivo disminuyó transcurridas 48 horas como cabe esperar debido al proceso

digestivo. Hay que resaltar que dos combinaciones amplificaron con éxito DNA de *Bactrocera oleae* tras 72 horas post ingesta, 253F – 334R (Figura 8D) y 334F – 440R (Figura 7D), aquellas que generan los amplicones de menor tamaño, de 81 pb y 106 pb respectivamente. La disminución de la detección del DNA de la mosca del olivo a lo largo del tiempo es consecuencia de la acción de las enzimas del depredador durante el proceso digestivo (Zaidi *et al.* 1999). Por tanto, este hecho resalta la importancia del diseño de los cebadores para amplificar fragmentos de pequeño tamaño empleando dianas de alto número de copias por genoma en estudios moleculares *post mortem* de la depredación, pues se incrementa la probabilidad de detección del DNA de presa a lo largo del tiempo apoyando lo indicado por King *et al.* (2008).

En resumen, nuestras combinaciones de cebadores fueron capaces de amplificar con alta especificidad DNA de la mosca del olivo incluso a una concentración de 1pg / μ L en mezclas heteroespecíficas de DNA y de detectar ingesta de una sola pupa de *B. oleae* en el tracto digestivo del depredador, transcurridas 72 horas de dicha ingesta. Sólo hay publicado un trabajo sobre detección de DNA de *B. oleae* en tracto digestivo, en este caso del carábido *Pterostichus globosus* con dos parejas de cebadores que amplificaban fragmentos de 108 y 214 pb del gen COI (Rejili *et al.* 2016) aunque con menor sensibilidad, los ensayos de alimentación se suministraban dos pupas de *B. oleae* y la concentración óptima de DNA molde para la PCR era de 50 ng. Considerando las consecuencias de la presencia *B. oleae* en los olivares de la Península Ibérica, todos los estudios resultan valiosos para la lucha efectiva contra esta plaga.

Con el fin de estudiar las redes tróficas y determinar qué artrópodos podrían ser los más adecuados para llevar a cabo el control de las poblaciones de la mosca del olivo tanto en primavera – verano como en otoño e invierno, realizamos una primera aproximación en campo recogiendo 94 artrópodos edáficos pertenecientes a los grupos Araneae, Formicidae, Dermaptera y Carabidae. Se detectó ingesta de *B. oleae* en el 20% de la muestra (Figura 9D), destacando la contribución de los dermápteros y arañas como los mayores depredadores (Tabla 9D). Las arañas son los depredadores predominantes de numerosos ecosistemas (Picchi *et al.* 2016). Dada la laboriosidad, y en ocasiones dificultad, que conllevan los estudios en campo, solo hemos encontrado en la bibliografía un trabajo que aborde análisis moleculares de la depredación sobre el potencial de las arañas para el control biológico, en este caso, de *C. capitata* por *Pardosa cribata*, y se confirmó la ingesta de este tefrítido en el 15% de las arañas recogidas en los cultivos (Monzó *et al.* 2010). Por otro lado, la tijereta *Forficula auricularia*, el dermáptero más común, ha sido propuesto como candidato para el control biológico del ácaro *Dysaphis plantaginea* en los manzanos de Francia (Dib *et al.* 2016). Por ello, futuros estudios

centrados en la fenología de estos dos grupos taxonómicos podrán determinar la relevancia de estos depredadores en control biológico de las poblaciones de la mosca del olivo.

Igualmente, en esta primera aproximación el 14.3% de las hormigas había consumido *Bactrocera oleae* confirmando el importante papel de este grupo en el ecosistema olivarero que ya se había puesto de manifiesto en olivares de California (Orsini *et al.* 2007). La contribución de este grupo a la depredación de las pupas de la mosca del olivo debe ser tomada muy en cuenta en la gestión integrada de la plaga.

Por último, de los 44 carábidos recogidos en los olivares del sur de la comunidad de Madrid, se ha confirmado en 6 la ingesta de mosca del olivo, un 13.6%. Los estudios de respuesta funcional con diferentes carábidos han mostrado que, aun cuando todos son capaces de consumir pupas de *B. oleae*, hay diferencias en cuanto al número de presas ingeridas y sus preferencias alimenticias (Dinis *et al.* 2016). Esta menor ingesta de *Orthomus barbarus* puede guardar relación con su pequeño tamaño, su preferencia por otras presas del suelo del olivar o el tiempo que invierten en manipular a las presas hasta su total consumo. Nuestras condiciones experimentales en el laboratorio impedían a los individuos elegir otro tipo de alimentación mientras que, en el campo, la abundancia de presas alternativas ha podido poner de manifiesto la limitada capacidad de esta especie en el control biológico de la mosca del olivo, por lo que sería recomendable identificar y potenciar la presencia de otras especies de carábidos y de artrópodos más voraces en el agro-ecosistema. No obstante, la relevancia de los coleópteros en el control biológico de *B.oleae* se ha evidenciado en el reciente trabajo de Albertini *et al.* (2018) donde el análisis molecular del contenido gástrico de estafilínidos recogidos en olivares de Italia confirmó la presencia de DNA de mosca del olivo en el 24.5% de las muestras. En la actualidad, seguimos trabajando para aumentar el número de ejemplares analizados en el estudio sobre redes tróficas del olivar.

El objetivo de los programas de Gestión Integrada de Plagas es encontrar y promover acciones ambientalmente sostenibles para controlar los niveles de las plagas potenciando los trabajos sobre el empleo de enemigos naturales de la mosca del olivo como complemento a los insecticidas y otros métodos tradicionales (Daane y Johnson 2010). Se han realizado enormes esfuerzos por caracterizar la artropodofauna del agro-ecosistema del olivar y definir los potenciales depredadores de *B. oleae*, pero ninguna especie edáfica ha podido ser confirmada como un potencial agente de control (Dinis *et al.* 2015; Gkisakis *et al.* 2016; Picchi *et al.* 2016).

En este capítulo, se ha planteado el abordaje molecular para el estudio post mortem de la depredación mediante PCR. Se han diseñado parejas de cebadores altamente específicos de *Bactrocera oleae* y se ha puesto a punto un método rápido, sensible y preciso de detección de su DNA. La idoneidad de los cebadores diseñados para este fin ha quedado reflejada en ensayos de especificidad y sensibilidad en el laboratorio y en el estudio en campo. En definitiva, este trabajo proporciona una herramienta útil y valiosa para determinar la contribución de los diferentes artrópodos edáficos al control biológico de la mosca del olivo, una alternativa de gestión de la plaga más solidaria con el medioambiente que los insecticidas.

Anexo 1

Especie	Orden	AN (Genbank)	BIN (BOLD)
<i>Amara aenea</i>	Coleoptera	KJ961903	COLFF827-13
<i>Amara aenea</i>	Coleoptera	KJ962272	COLFF826-13
<i>Amara aenea</i>	Coleoptera	KJ964730	COLFF728-13
<i>Amara aenea</i>	Coleoptera	KJ965182	COLFF318-13
<i>Amara aenea</i>	Coleoptera	KJ966903	COLFD525-12
<i>Amara similata</i>	Coleoptera	GU347054	GBMIN41108-14
<i>Amara similata</i>	Coleoptera	GU347055	GBMIN41109-14
<i>Amara similata</i>	Coleoptera	GU347056	GBMIN41110-14
<i>Amara similata</i>	Coleoptera	KJ964643	COLFD421-12
<i>Amara similata</i>	Coleoptera	KJ966405	COLFD536-12
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	DQ006871	GBDP1918-06
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	DQ006872	GBDP1919-06
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	DQ116253	GBDP2106-06
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	DQ116255	GBDP2108-06
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	DQ116257	GBDP2110-06
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	DQ116258	GBDP2111-06
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	DQ116259	GBDP2112-06
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659617	GBDPT936-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659618	GBDPT937-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659619	GBDPT938-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659620	GBDPT939-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659621	GBDPT940-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659622	GBDPT941-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659623	GBDPT942-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659624	GBDPT943-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659625	GBDPT944-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659626	GBDPT945-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659627	GBDPT946-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659628	GBDPT857-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659629	GBDPT858-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659630	GBDPT859-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659631	GBDPT860-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659632	GBDPT861-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659633	GBDPT862-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659634	GBDPT863-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659635	GBDPT864-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659636	GBDPT865-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659637	GBDPT866-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659638	GBDPT867-14
<i>Bactrocera carambolae</i>	Diptera	KF659639	GBDPT868-14
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116267	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116268	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116269	-

<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116270	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116271	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116272	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116273	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116274	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116275	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116276	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116277	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116278	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116279	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116280	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	DQ116281	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692678	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692694	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692706	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692747	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692758	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692775	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692790	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692829	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JQ692864	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JX266411	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JX266413	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JX266414	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	JX266415	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659645	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659647	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659650	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659653	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659657	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659658	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659661	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659665	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659667	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659668	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659669	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659670	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659671	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659676	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659677	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659678	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659684	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659685	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659687	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659688	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659691	-

<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659694	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659696	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659699	-
<i>Bactrocera dorsalis</i>	Diptera	KF659700	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692669	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692698	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692710	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692720	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692721	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692724	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692725	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692733	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692743	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692744	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692754	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692763	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692769	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692770	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692782	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692785	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692788	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692791	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692792	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692795	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692798	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692804	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692812	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692815	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692822	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692826	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692827	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692828	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692831	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692846	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692847	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692852	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692855	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692857	-
<i>Bactrocera invadens</i>	Diptera	JQ692858	-
<i>Bactrocera makilingensis</i>	Diptera	DQ116302	-
<i>Bactrocera occipitalis</i>	Diptera	DQ116310	-
<i>Bactrocera occipitalis</i>	Diptera	DQ116311	-
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005742	GBMIN16449-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005743	GBMIN16459-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005744	GBMIN16448-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005745	GBMIN16458-13

<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005746	GBMIN16447-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005747	GBMIN16457-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005748	GBMIN16446-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005749	GBMIN16456-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005750	GBMIN16445-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005751	GBMIN16455-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005752	GBDPT097-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005753	GBMIN16454-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005754	GBMIN16444-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005755	GBMIN16453-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005756	GBMIN16443-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005757	GBMIN16452-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005758	GBMIN16442-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KC005759	GBMIN16451-13
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704356	GBDP17421-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704357	GBDP17422-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704358	GBDP17423-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704359	GBDP17424-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704360	GBDP17425-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704361	GBDP17426-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704362	GBDP17427-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704363	GBDP17428-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704364	GBDP17429-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704365	GBDP17430-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704366	GBDP17431-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704367	GBDP17432-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704368	GBDP17433-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704369	GBDP17434-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704370	GBDP17435-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704371	GBDP17436-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704372	GBDP17437-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704373	GBDP17438-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704374	GBDP17439-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704387	GBDP17452-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704388	GBDP17453-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704389	GBDP17454-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704390	GBDP17455-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704391	GBDP17456-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704392	GBDP17457-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704393	GBDP17458-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704394	GBDP17459-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704395	GBDP17460-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704396	GBDP17461-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704397	GBDP17462-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704398	GBDP17463-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704399	GBDP17464-15

<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704400	GBDP17465-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704401	GBDP17466-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704402	GBDP17467-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704403	GBDP17468-15
<i>Bactrocera oleae</i>	Diptera	KP704404	GBDP17469-15
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	DQ006873	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	DQ006874	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	DQ116321	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	DQ116324	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	DQ116326	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659722	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659723	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659724	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659725	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659726	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659727	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659728	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659729	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659730	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659731	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659732	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659733	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659734	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659735	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659736	-
<i>Bactrocera papayae</i>	Diptera	KF659737	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692663	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692697	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692714	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692736	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692748	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692760	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692796	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692834	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692848	-
<i>Bactrocera paraverbascifoliae</i>	Diptera	JQ692862	-
<i>Bactrocera philippinensis</i>	Diptera	DQ116315	-
<i>Bactrocera philippinensis</i>	Diptera	DQ116316	-
<i>Bactrocera philippinensis</i>	Diptera	DQ116317	-
<i>Bactrocera philippinensis</i>	Diptera	DQ116318	-
<i>Bactrocera philippinensis</i>	Diptera	DQ116319	-
<i>Bactrocera philippinensis</i>	Diptera	DQ116320	-
<i>Bactrocera verbascifoliae</i>	Diptera	DQ116349	-
<i>Bactrocera verbascifoliae</i>	Diptera	DQ116350	-
<i>Bactrocera zonata</i>	Diptera	DQ116358	-
<i>Bactrocera cacuminata</i>	Diptera	DQ116238	-

<i>Bactrocera cacuminata</i>	Diptera	DQ116239	-
<i>Bactrocera cacuminata</i>	Diptera	DQ116240	-
<i>Bactrocera cacuminata</i>	Diptera	DQ116241	-
<i>Bactrocera cognata</i>	Diptera	DQ116250	-
<i>Bactrocera cognata</i>	Diptera	DQ116252	-
<i>Calathus ambiguus</i>	Coleoptera	AJ404992	GBCL7931-12
<i>Calathus ambiguus</i>	Coleoptera	GU254296	GBCL7929-12
<i>Calathus ambiguus</i>	Coleoptera	GU254307	GBCL7930-12
<i>Calathus ambiguus</i>	Coleoptera	GU254308	GBCL7928-12
<i>Calathus ambiguus</i>	Coleoptera	KJ965504	COLFE251-12
<i>Calathus ambiguus</i>	Coleoptera	KJ965863	COLFD564-12
<i>Calathus ambiguus</i>	Coleoptera	KJ967392	COLFE249-12
<i>Calathus granatensis</i>	Coleoptera	AJ404991	GBCL7941-12
<i>Calathus hispanicus</i>	Coleoptera	AJ404995	GBCL7881-12
<i>Calathus korax</i>	Coleoptera	JQ688475	GBMIN19387-13
<i>Calathus melanocephalus</i>	Coleoptera	KJ966762	COLFF215-13
<i>Calathus mollis</i>	Coleoptera	AJ404997	GBCL7947-12
<i>Calathus mollis</i>	Coleoptera	FJ173193	GBCL4028-09
<i>Calathus mollis</i>	Coleoptera	GU254294	GBCL7946-12
<i>Carabus syriacus galilaeus</i>	Coleoptera	JQ646559	GBMIN22420-13
<i>Harpalus distinguendus</i>	Coleoptera	AJ583347	GBCL7768-12
<i>Harpalus distinguendus</i>	Coleoptera	KJ967303	COLFD742-12
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	GU347226	GBMIN41280-14
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	GU347227	GBMIN41281-14
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	GU347228	GBMIN41282-14
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	HM411781	BBCEC086-09
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	HM411783	BBCEC088-09
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	HM411949	BBCEC282-09
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	KJ962279	COLFA137-10
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	KJ964139	COLFE377-12
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	KJ964153	COLFB530-12
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	KJ964281	COLFE285-12
<i>Harpalus rufipes</i>	Coleoptera	KJ965239	COLFE409-12
<i>Harpalus smaragdinus</i>	Coleoptera	KJ963159	COLFE743-13
<i>Ophonus azureus</i>	Coleoptera	AJ583367	GBCL7796-12

Anexo 1. Secuencias de la región 5' del gen mitocondrial COI de *B. oleae*, tefritidos filogenéticamente cercanos y carábidos empleadas para el desarrollo de los cebadores especie específicos. AN, código de acceso (*Accession number*) de la secuencia en las bases de datos del Genbank; BIN (*Barcoding Index Number*), código de la secuencia en las bases de datos del BOLD.

Discusión general

La mosca del olivo, *Bactrocera oleae* (Rossi 1790), es la plaga más dañina del olivar Mediterráneo, llegando a causar un descenso del 15% de la producción olivarera y una disminución del 25% en la calidad del aceite, lo que se traduce en grandes pérdidas económicas (Muñoz y García 2012). Teniendo en cuenta las graves consecuencias derivadas de la presencia de este díptero en los olivares, resulta fundamental un control eficaz de sus poblaciones. Para ello, es indispensable profundizar en el conocimiento genético de la plaga analizando más exhaustivamente su estructura genética, caracterizando las resistencias a organofosforados y abordando el diseño de herramientas moleculares para evaluar la contribución de la fauna edáfica olivarera al control biológico por depredación como medida más respetuosa con el agro-ecosistema.

El empleo simultáneo de marcadores mitocondriales y nucleares en el presente trabajo, ha permitido aprovechar las ventajas que ambos ofrecen para ahondar en la determinación de los niveles de variabilidad y la estructura genética de las poblaciones españolas de la mosca del olivo, hasta ahora pobremente caracterizadas. Se trata, además, del primer estudio que recoge información de ambos tipos de marcadores moleculares en otras doce poblaciones procedentes de cinco países productores de la cuenca mediterránea.

Mediante la secuenciación de 1151 pares de bases, casi el gen completo mitocondrial COI, se han detectado setenta y tres haplotipos, de los cuales ocho se encontraron a frecuencias intermedias en las poblaciones muestreadas. En España se identificaron 54 de estos 73 haplotipos (Tablas 3F y 4F). A nivel nuclear, las poblaciones mostraron un porcentaje de polimorfismo elevado, oscilando entre el 66.97 % y el 91.67%, y una heterocigosis (H) de 0.57 – 0.35 (Tablas 9F y 10F), en concordancia con los niveles de variabilidad genética detectados al analizar la secuencia del gen COI en estas las poblaciones. En conjunto, la diversidad genética que albergan las poblaciones de mosca del olivo resultó muy elevada y superó la observada en la bibliografía empleando tanto marcadores mitocondriales (NADH, [Nardi *et al.* 2005] y COI [Matallanas *et al.* 2013]) como nucleares (RAPD [Segura 2002], ISSR [Hernández *et al.* 2012], SSR [Augustinos *et al.* 2005]).

La considerable variabilidad genética de la especie puede atribuirse principalmente a dos factores, el largo tiempo que lleva establecida en el Mediterráneo, pues algunos trabajos sugieren que *B. oleae* puede haber estado viviendo en acebuches desde hace al menos 400.000 años (Nardi *et al.* 2010) y su elevado tamaño poblacional, favorecido por la vasta extensión dedicada a este cultivo, la gran fecundidad de las hembras (Ruiz Castro 1947) y un ciclo polivoltino de entre dos y cinco generaciones por año (Jiménez *et al.* 1994).

La distribución geográfica de esta variabilidad genética no es homogénea. De la información mitocondrial se infiere que en el Mediterráneo existen dos grandes grupos genéticos *Este* y *Oeste* con subestructura en este último grupo tal y como se observa, entre otros, en los análisis de agrupación llevados a cabo (Figuras 5F, 6F y 9F). El primero de ellos, el grupo *Este* comprende las tres poblaciones de Israel y la más meridional de Grecia (GRE3) y el segundo grupo, *Oeste*, englobaría las poblaciones de la Península Ibérica, Italia, las muestras griegas Grecia 1 y 2 y Túnez (Figuras 4F, 7F y 8F). Cabe señalar, además, que en el grupo *Oeste* se aprecia subestructura genética, las poblaciones de la Península Ibérica, Italia y Túnez, constituirían entidades genéticas diferentes (Tabla 6F y Figura 5F).

El principal factor que habría conformado la estructura poblacional detectada sería el flujo genético entre las poblaciones de cada grupo (*Este* Nm: 3.51, *Oeste* Nm: 3.14,) y un limitado de intercambio entre ambos (Nm *Este* – *Oeste* promedio 0.27) (Tabla 7F). Este importante flujo genético se vería favorecido por el cultivo intensivo en la cuenca mediterránea, donde se concentra más del 90% de la producción mundial, y por la capacidad de dispersión de la mosca del olivo (Economopoulos *et al.*, 1978; Brnetic *et al.*, 1981; Rice 2000).

Las rutas de colonización de la especie constituirían el segundo factor que ha contribuido a conformar la estructura genética de las poblaciones de *Bactrocera oleae* revelada por el marcador mitocondrial. Trabajos previos habían indicado una estructuración de la diversidad genética de la mosca del olivo en el Mediterráneo estrechamente relacionada con las vías de dispersión. No obstante, existe controversia en cuanto a la estructura genética observada y las rutas seguidas, tal vez por el limitado número de muestras analizadas, principalmente en el mediterráneo occidental, y la naturaleza del marcador molecular empleado. La elevada diversidad genética encontrada en las poblaciones de España y la presencia de haplotipos exclusivos (Tablas 3F, 4F y 10F) no corroborarían la hipótesis de una expansión de la especie desde Oriente medio hacia el oeste a lo largo de las tres penínsulas (Augustinos *et al.* 2005; Zygouridis *et al.* 2009), en paralelo a la difusión del olivo cultivado. El probable origen africano del olivo y los resultados genéticos del presente trabajo, enriquecidos por la adición de secuencias adicionales de esta especie (Figura 8F), parecen indicar que las rutas de colonización de la mosca irían en paralelo con las del olivo. Las inferencias demográficas a partir de nuestros datos de variación genética estiman la última expansión de la mosca del olivo en el Mediterráneo hace unos 61,000 años, en el Pleistoceno, cuando las fluctuaciones climáticas causaron un gran impacto en la distribución y evolución de las especies de las regiones templadas (Corrales *et al.* 2013). Por lo tanto, los resultados apuntan a

que *Bactrocera oleae* ya estuviese establecida en la variedad silvestre, el acebuche, y la estructura genética detectada contase con un componente más antiguo, asociado a la fragmentación de su hospedador, en diferentes refugios glaciares (Nardi y Frati 2011).

Los datos del presente trabajo indican que las poblaciones de *B. oleae* de la Península Ibérica no presentan diferenciación genética y apuntan a la existencia de una única, gran población (Tablas 5F y 10F y Figuras 5F y 13F), muy conectada dados los elevados valores de intercambio genético (Tabla 7F, ISSR $Nm=2.51$). Las mismas conclusiones se extraen cuando se analizan las poblaciones muestreadas en Israel y en Túnez; en ambos casos se podrían considerar dos metapoblaciones. Estos resultados filogeográficos tiene una gran importancia en términos de gestión de plagas, pues la enorme conexión que existe entre muchas de las poblaciones de *B. oleae* estudiadas favorecería la rápida dispersión de variantes genéticas, entre ellas, las relacionadas con la resistencia a algunos insecticidas.

Desde los años 50 el control clásico de insectos plaga se ha realizado con la aplicación de insecticidas que, junto a los avances biotecnológicos en los cultivos, ha derivado en notables aumentos de producción (Pingali 2012). Como en muchas otras plagas de impacto agronómico, el control de *B. oleae* se realiza con insecticidas, cuyo éxito se ve comprometido por la presencia de alelos resistentes. Los insecticidas organofosforados son algunos de los compuestos químicos aprobados por la Comisión Europea para su uso en el sector olivarero.

A pesar del peso del cultivo olivarero en la economía española y del incremento de las resistencias a los organofosforados durante las últimas décadas, la caracterización de las tres mutaciones en el gen *ace* que confieren resistencia a estos insecticidas ha sido muy limitada en poblaciones españolas de *B. oleae*.

El intenso muestreo de poblaciones del territorio olivarero español para el presente trabajo ha reflejado una frecuencia de las dos mutaciones puntuales en los exones IV y VII del gen *ace* que confieren resistencia próxima al 75% en ambos casos, una estima superior a la observada en trabajos previos (Hawkes *et al.* 2005; Nardi *et al.* 2006; Pereira – Castro *et al.* 2015). La presión de selección generada por los insecticidas no queda limitada en España al entorno olivarero ni a la especie *B. oleae*. A modo ilustrativo, en la mosca blanca, *Bemisia tabaci*, se han encontrado en Almería diferentes biotipos que sobreexpresan distintas esterasas, las cuales reducen de forma significativa la mortalidad en presencia de neonicotinoides (Elbert y Nauen 2000). La eficacia de los tratamientos con diferentes organofosforados se ha visto reducida en poblaciones de *Cydia pomonella* como consecuencia

del aumento de la actividad de enzimas esterasas, transferasas y oxidasas (Rodríguez *et al.* 2010).

Esta enorme presión de selección también se pone de manifiesto en frecuencia de aparición y distribución de las mutaciones que confieren resistencias a los insecticidas organofosforados y a la marcada estructura haplotípica encontrada en el alelo A12, el mismo que presentan todos los individuos con genotipo resistente. Asimismo, el alelo A12 difiere del alelo sensible A5 en el único nucleótido que provoca el cambio aminoacídico que confiere la resistencia a insecticidas (Tabla 2R y Figura 2R). En el estudio filogeográfico de este trabajo se observa que dicho alelo A5 es característico de moscas del olivo de Grecia, Túnez e Israel y se ha descrito en moscas de Turquía (Nardi *et al.* 2006, alelo G). Todos estos resultados podrían señalar el posible origen del alelo A12 en el Mediterráneo oriental.

Junto a las poblaciones de *Bactrocera oleae* de España, donde el genotipo del 60% de las moscas es homocigoto para los alelos de resistencia en los dos exones, destacan las poblaciones de Italia y Grecia, con un 80% y 89.6% respectivamente. A la luz de estos datos resulta evidente que la combinación de ambos alelos proporciona una ventaja frente al resto en un entorno olivarero tratado con pesticidas. Teniendo en cuenta que estos dos países dedican más de un millón de hectáreas al cultivo del olivo y que tras nuestro país son los mayores productores de aceite y aceituna del mundo (FAO), resultaría fundamental la evaluación de la frecuencia de estos alelos resistentes a lo largo del tiempo para una mejor gestión de la plaga.

A diferencia de estos países que junto con España presentan las mayores frecuencias de resistencias a organofosforados, resaltan los datos obtenidos para las poblaciones de Israel y Túnez. En Israel la mitad de los ejemplares fueron sensibles a estos insecticidas, un resultado que contrasta con el único estudio encontrado en la bibliografía donde no se identificaron estos alelos resistentes (Nardi *et al.* 2006). En este contexto, sería interesante comprobar si la eficacia de las medidas tomadas por el gobierno israelí para limitar el uso de productos químicos de uso agrario (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Israel, MoAg) frena el aumento de las resistencias a estos compuestos. Las poblaciones de Túnez, que por otra parte no habían sido estudiadas hasta el presente trabajo, reflejaron genotipos sensibles a insecticidas a excepción de un individuo con la resistencia del exón VII en heterocigosis. En este país se emplean los compuestos organofosforados en el control de plagas (Cheikh *et al.* 1998; Elfekih *et al.* 2014) por lo que es posible que estos alelos resistentes aún no se hayan

expandido desde las poblaciones del norte mediterráneo o bien que se hayan introducido recientemente y debido a su baja frecuencia no hayan sido detectados.

Finalmente, en este trabajo llama la atención la baja presencia de la delección en el exón X en comparación con lo observado en las mutaciones puntuales de los exones IV y VII. Con una frecuencia del 2.5% en todo el Mediterráneo solo se ha encontrado en moscas de la Península Ibérica, Israel y Grecia y siempre en heterocigosis, poniendo de manifiesto el impacto sobre la eficacia biológica del individuo que la porta.

Estos hallazgos sobre la elevada frecuencia y amplia distribución de las mutaciones que confieren resistencia a los OP en la cuenca norte mediterránea resultan de gran relevancia y tienen una repercusión directa en el sector productivo olivarero, pues todos los programas de control de la mosca del olivo incluyen el empleo de productos químicos en momentos de elevada densidad de la plaga. Una medida prometedora de la gestión integrada de plagas es el control biológico mediante potenciales depredadores generalistas presentes en el agroecosistema regulando las poblaciones de la mosca del olivo en sus estadios más vulnerables, larva y pupa (Picchi *et al.* 2017). Lamentablemente, determinar los enemigos naturales de una especie e inferir la contribución de los mismos a la depredación resulta un proceso complicado.

Por ello, nuestro objetivo ha sido la puesta a punto de la técnica de detección por PCR de DNA de *Bactrocera oleae* en el tracto digestivo de los artrópodos recogidos en el agroecosistema olivarero con el fin de determinar la contribución de cada grupo al control integrado de esta plaga. En este contexto, el diseño de cebadores que amplifiquen fragmentos de DNA de pequeño tamaño, de genes multicopia y en regiones de máxima variabilidad interespecífica garantiza el éxito de esta herramienta molecular (King *et al.* 2008, 2010; Sint *et al.* 2011). En el presente trabajo se han diseñado 7 cebadores capaces de amplificar pequeños fragmentos de DNA de la región 5' del gen mitocondrial COI.

Las siete combinaciones de cebadores de este estudio (Tabla 1D y Figura 2D) reflejaron una enorme especificidad y sensibilidad (Figuras 6D y 7D), revelando la idoneidad de los mismos para la detección molecular de la depredación de *B. oleae*. Los resultados de los ensayos de alimentación pusieron de manifiesto la eficacia de todas las combinaciones de cebadores al amplificar DNA de *B. oleae* en condiciones reales de digestión (Tabla 3D), destacando las combinaciones 253F – 334R y 334F – 440R capaces de detectar, 72 horas después, la ingestión de una sola pupa de *B. oleae*. Ambas combinaciones generan los amplicones de menor tamaño, de 81 pb y 106 pb respectivamente, resaltando la importancia

de amplificar fragmentos de pequeño tamaño para incrementar la probabilidad de detección del DNA de presa a lo largo del tiempo (Harwood *et al.* 2007; King *et al.* 2010; Monzó *et al.* 2010; Moreno-Ripoll *et al.* 2012; Lantero *et al.* 2018).

Estas dos parejas de cebadores se emplearon en una primera aproximación realizada con 94 artrópodos recogidos en olivares del sur de la Comunidad de Madrid para determinar la contribución de los grupos Araneae, Dermaptera, Formicidae y Carabidae al control de las poblaciones de la mosca del olivo, donde se confirmó que el 20% de la muestra había ingerido *B. oleae* (Tabla 4D y Figura 8D). Las arañas son los depredadores generalistas predominantes de numerosos ecosistemas (Picchi *et al.* 2016), considerando sus hábitos cazadores, es posible que su contribución al control biológico de *Bactrocera oleae* tenga lugar preferentemente durante la emergencia del adulto (Dinis *et al.* 2016), sin descartar la depredación sobre las pupas. Por otro lado, los dermápteros son voraces depredadores generalistas y la especie más común, la tijereta *Forficula auricularia*, es candidata para el control biológico del ácaro *Dysaphis plantaginea* en los manzanos de Francia (Dib *et al.* 2016). También se ha visto que *Forficula aetolica* (Brunner 1882) es capaz de depredar pupas de *B. oleae* en condiciones experimentales de laboratorio (Neuenschwander *et al.* 1986).

En esta aproximación se ha confirmado la ingesta *B. oleae* por hormigas, un grupo de gran abundancia en el ecosistema olivarero. Así mismo, se ha comprobado que especies granívoras como *Messor barbarus* (Linnaeus 1767), entierran las pupas en el hormiguero (Neuenschwander *et al.* 1986), lo que también contribuye a la reducción de adultos emergentes en primavera. Finalmente, de los 44 carábidos recogidos, 6 habían ingerido mosca del olivo. La relevancia de los coleópteros en la depredación de *B. oleae*, en concreto la voracidad de los estafilínidos, se ha evidenciado en los trabajos de Albertini *et al.* (2018) en olivares de Italia. Teniendo en cuenta la abundancia de estos grupos en los ecosistemas, su contribución al control biológico de la mosca del olivo debe ser tomada muy en cuenta en la gestión integrada de la plaga.

En definitiva, el enorme impacto económico y ambiental derivado de la presencia de la especie plaga *B. oleae* en los olivares hace necesaria una gestión adecuada de sus poblaciones. Tal y como se ha planteado, el conocimiento genético es fundamental para conocer las dinámicas poblacionales de la especie e identificar la presencia de alelos resistentes a insecticidas. Este conocimiento derivará en la búsqueda de alternativas de control eficaces que impliquen un uso más racional de los productos químicos relegando su uso a momentos de elevada infestación, promoviendo aquellas medidas que sean más solidarias con el ambiente.

Conclusiones

- El análisis de las secuencias del gen mitocondrial de la enzima Citocromo Oxidasa subunidad I y los marcadores nucleares ISSR han puesto de manifiesto que *Bactrocera oleae* presenta una elevada diversidad genética en España.
- Esta gran diversidad puede atribuirse al gran tamaño efectivo de sus poblaciones y al tiempo que lleva establecida en el área estudiada.
- No existe diferenciación genética entre las poblaciones de la Península Ibérica, que constituirían una única población desde un punto de vista genético.
- La distribución de la variabilidad genética permite diferenciar dos grupos genéticos en la cuenca mediterránea: Este, que incluiría poblaciones de Grecia e Israel y Oeste con las poblaciones de la Península Ibérica, Italia, poblaciones de Grecia y Túnez. Este segundo grupo exhibe subestructura genética, las muestras de la Península Ibérica, Túnez e Italia constituirían entidades genéticas distintas.
- El flujo génico indica niveles suficientes de intercambio genético para impedir la diferenciación dentro de cada grupo genético.
- Los resultados apoyarían la hipótesis de que las rutas de colonización de la mosca en el área mediterránea discurrirían en paralelo con las del olivo. Partiendo de una población ancestral africana, una vía iría hasta Oriente Medio y desde allí, hacia el oeste; otra ruta ascendería hacia el norte de África, alcanzando las penínsulas Ibérica e Itálica. Tras la última glaciación, desde los refugios glaciales situados en las tres penínsulas del norte del Mediterráneo, las poblaciones de *B. oleae* se habrían expandido dando lugar a la estructura genética actual.
- El tiempo estimado desde la última expansión de las poblaciones del Mediterráneo sitúa este proceso en el Pleistoceno.
- El estudio de las mutaciones puntuales en los exones IV y VII del gen ace que confieren resistencia a los insecticidas organofosforados ha revelado una elevada incidencia en las poblaciones españolas de mosca del olivo, en ambos próxima al 75%, similar a la frecuencia media en el conjunto de las poblaciones, excluyendo las africanas.
- Estas dos mutaciones están ampliamente distribuidas por la cuenca norte del mediterráneo. En las poblaciones de Túnez y Baleares la frecuencia detectada fue ínfima.
- El análisis de la secuencia del exón IV mostró 13 haplotipos o alelos. Todos ellos sensibles a los organofosforados excepto dos alelos con el polimorfismo en la posición 122 (A12), el que confiere la resistencia.
- La huella de la selección reciente de este polimorfismo se ha visto reflejada en el arrastre de 4 polimorfismos neutros y la ausencia de variabilidad genética en las zonas flanqueantes al polimorfismo que confiere la resistencia.

- Esta marcada estructura haplotípica señala un origen único de la mutación. El estudio filogeográfico sitúa el posible origen de este alelo en regiones del Mediterráneo oriental.
- El análisis conjunto de los exones IV y VII ha puesto de manifiesto la ventaja proporcionada por la combinación de estos dos alelos en un entorno olivarero tratado con pesticidas.
- La delección del exón X aparece a baja frecuencia tanto en España como en el Resto del Mediterráneo, y siempre en heterocigosis, indicando un efecto delétere de la misma.
- El diseño de cebadores específicos del DNA de mosca del olivo en secuencias multicopia incrementa el éxito de la técnica en los estudios moleculares post-mortem de la depredación para determinar la contribución de los potenciales enemigos naturales al control biológico de la plaga *Bactrocera oleae*.
- Los resultados reflejan la elevada especificidad de las 7 combinaciones de cebadores al amplificar única y exclusivamente DNA de mosca del olivo y no el de otras especies filogenéticamente cercanas o artrópodos del ecosistema.
- Los cebadores también reflejaron una elevada sensibilidad al detectar cantidades ínfimas de DNA de *Bactrocera oleae* (2pg) cuando éste se encontraba en mezclas heteroespecíficas de DNA.
- La gran utilidad de esta herramienta molecular se ha evidenciado en ensayos de alimentación empleando *O. barbarus* como depredador. Todas las combinaciones de cebadores amplificaron DNA de mosca del olivo transcurridas 48 horas de la ingesta de una sola pupa. Dos de las combinaciones, 253F – 334R y 334F – 440R, resultaron las de mayor eficacia al amplificar DNA de *B. oleae* en el tracto digestivo del depredador a las 72 horas post-ingesta de la pupa.
- La primera aproximación en campo realizada con 94 artrópodos recogidos de olivares madrileños en primavera y otoño confirmó la idoneidad de los cebadores diseñados y del método desarrollado en condiciones reales de depredación. El 20% de la muestra había consumido *B. oleae*.
- Los cuatro grupos taxonómicos muestreados Dermaptera, Araneae, Formicidae y Carabidae habían ingerido moscas del olivo, si bien los dos primeros mostraron una tasa mayor de depredación.
- La relevancia de estos grupos debe ser tomada en cuenta en los abordajes basados en el control biológico contemplados por las GIP. Futuros análisis de un mayor número de muestras ayudarán a determinar con mayor precisión la contribución de cada grupo y/o especie en cada fase del ciclo biológico de la mosca del olivo.

Conclusions

- The analysis of the mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit I (COI) gene sequences and the ISSR nuclear markers have revealed a high genetic diversity in the Spanish populations of *Bactrocera oleae*.
- This great diversity would be related to the large size of its populations and the elapsed time since this pest has been established in the area studied.
- There is not genetic differentiation between the Iberian Peninsula populations. Thus, they would be considered as a single large population.
- The genetic variability has a geographical distribution that allows to differentiate two genetic groups in the Mediterranean basin: *East*, which would include populations of Greece and Israel and *West* with populations of the Iberian Peninsula, Italy, populations of Greece and Tunisia. This second group also exhibits genetic substructure, the samples from the Iberian Peninsula, Tunisia and Italy would constitute different genetic entities.
- The gene flow levels prevent differentiation within each genetic group.
- These results would support the hypothesis that the colonization routes of the olive fruit fly in the Mediterranean area would run in parallel with those of the olive tree. From an African ancestral population, a path would go to the Middle East and then, westwards; another route would ascend towards North Africa, reaching the Iberian and Italic peninsulas. After the last glaciation, *B. oleae* populations would have expanded from the different glacial refuges located in the three north Mediterranean Peninsulas, giving rise to the current genetic structure.
- The time elapsed since the last pest expansion in the Mediterranean basin places this process in the Pleistocene.
- The analysis of the two described point mutations in exons IV and VII of the *ace* gene that confer insecticide resistance to organophosphates has revealed a high incidence in Spanish populations of olive fly, in both exons near 75%, similar to the average frequency in the populations as a whole, excluding the African samples.
- These two mutations are widely distributed along the northern Mediterranean basin. In contrast, the frequency detected in the populations from Tunisia and the Balearic Islands was negligible.
- The sequence analysis of exon IV showed 13 haplotypes or alleles. All of them were sensible to organophosphates except allele A12, that carried the polymorphism at the position 122 that confers insecticide resistance.
- The recent selection of this polymorphism has been reflected in the sweep of 4 neutral polymorphisms and the lack of genetic variability in the adjacent regions to this polymorphism that confers the insecticide resistance.

- This marked haplotypic structure points to a single origin of the mutation. The present phylogeographic study places it in eastern Mediterranean regions.
- The analysis of exons IV and VII has shown the advantage provided by the combination of these two resistant alleles in an olive grove treated with pesticides.
- The exon X deletion appears at low frequency in Spain and also all over the Mediterranean basin, and always in heterozygosis, indicating fitness cost.
- The design of species specific primers to amplify multicopy sequences increases the success of *B. oleae* DNA detection in post-mortem molecular studies in order to determine the contribution of the potential natural enemies present at the agroecosystem to this pest biological control.
- The high specificity of these 7 primer combinations has been confirmed amplifying only and exclusively olive fruit fly DNA and not DNA from close related species or different arthropods from the olive agroecosystem.
- These primers also showed high sensitivity detecting minute quantities of *Bactrocera oleae* DNA (2pg) in heteroespecific DNA mixes.
- The utility of this reliable molecular tool has been confirmed in feeding trials using the carabid species *O. barbarus* as predator. All primer combinations amplify olive fruit fly DNA after 48 hours of a single pupa intake. Two of the combinations, 253F - 334R and 334F - 440R, had the highest efficiency when amplifying DNA from *B. oleae* in the predators' gut at 72 hours post - feeding.
- The preliminary field approach was carried out with 94 arthropods collected from olive groves in Madrid during spring and autumn. The suitability of the designed primers and the method developed was confirmed under real predation conditions, where 20% of the sample consumed *B. oleae*.
- The four taxonomic groups sampled, Dermaptera, Araneae, Formicidae and Carabidae had predated olive flies, although the first two showed a higher predation rate.
- The relevance of these groups should be taken into account in the biological control approaches contemplated by the pest guidelines. Further analyses with a larger number of samples will help to determine more precisely the contribution of these groups and / or species in each phase of the biological cycle of the olive fruit fly.

Bibliografía

Agencia para el Aceite de Oliva, AAO: <http://aplicaciones.magrama.es>

AGROES: <http://www.agroes.es/>

Albertini A, Marchi S, Ratti C, Burgio G, Petacchi R. (2018) *Bactrocera oleae* pupae predation by *Ocypus olens* detected by molecular gut content analysis. *BioControl* 63:227–239

Altschul SF, Madden TL, Chaffer AA, Zhang J, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.

ASAJA- Jaén 2017. Portugal apuesta por la modernización del olivar, aunque solo el 23% de su superficie es de riego.

Augustinos AA, Mamuris Z, Stratikopoulos EE, D'Amelio S, Zacharopoulou A, Mathiopoulou KD. (2005) Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of species. *Genetica* 125: 231 – 241.

Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Drosopoulos E, Kakani EG, Mavragani-Tsipidou P. (2008) Isolation and Characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9: 618.

Avice JC. (2004) *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (2ª Edición). Sinauer, Sunderland, MA. 684 pp.

Barcoding Of Life Database, BOLD: <http://v4.boldsystems.org/>

Barranco D. (2008) Variedades y Patrones. En: Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L. *El cultivo del olivo*. Mundi- Prensa y Junta de Andalucía 37-62.

Bartolini G, Petruccelli R, Tindall HD., Menini UG. (2002) Classification, origin, diffusion and history of the olive. *FAO, Roma (Italia)*.

Beroiz B, Callejas C, Alonso F, Ochando MD. (2008) Genetic structure of Spanish White clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) populations as determined by RAPD analysis: Reasons for optimism. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems* 18: 190 – 201.

Beroiz B, Ortego F, Callejas C, Hernández – Crespo P, Castañera P, Ochando MD. (2012) Genetic structure of Spanish populations of *Ceratitis capitata* revealed by RAPD and ISSR markers: implications for resistance management. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 10: 815 – 825.

Beard CB, Hamm DM, Collins FH. (1993) The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology* 2: 103-124.

Besnard G, Rubio de Casas R, Vargas P. (2007) Plastid and Nuclear DNA polymorphism reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea europaea*). *Journal of Biogeography* 34: 736 – 752.

Besnard G, Rubio de Casas R, Christin PA, Vargas P. (2009) Phylogenetics of *Olea* (Oleaceae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequences: Tertiary climatic shifts and lineage differentiation times. *Annals of Botany* 104: 143-160.

BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). Ratnasingham S, Hebert PDN, 2007. *Mol Ecol Notes*, 7: 355-364.

Bower AV. (1994) Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *PNAS* 91: 6491 – 6495.

Breton C, Terral JF, Pinatel C, Médail F, Bonhomme F, Bervillé A. (2009) The origins of the domestication of the olive tree. *Comptes Rendus Biologies* 332: 1059 – 1064.

Brown PMJ, Ingels B, Wheatley A, Rhule EL, de Clercq P, van Leeuwen P, Thomas A, (2014). Intraguild predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on native insects in Europe: molecular detection from field samples. *Entomological Science* 18: 130-133

Buhay JE. (2009) COI – like sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology* 29: 96 – 110.

California Department of Food and Agriculture, CDFA: www.cdfa.ca.gov

Cha DJ y Lee SH. (2015) Evolutionary origin and status of two insect acetylcholinesterases and their structural conservation and differentiation. *Evolution and Development* 17: 109 – 119.

Cheikh HB, Ali-Haouas ZB, Marquine M, Pasteur N. (1998) Resistance to Organophosphorus and Pyrethroid Insecticides in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) from Tunisia. *Journal of Medical Entomology*. 35: 251 – 260.

Collier TR y Van Steenwyk. (2003) Prospects for integrated control of olive fruit fly are promising in California. *California Agriculture* 57: 28 – 31.

Consejo Oleícola Internacional (COI): www.internationaloliveoil.org

Corrales C, Pavlovskaya M, Höglund. (2013) Phylogeography and subspecies status of Black Grouse. *Journal of Ornithology* 155: 13-25.

Couso – Ferrer F. (2012) Bases moleculares de la Resistencia a insecticidas en la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

Daane KM, Sime K, Wang XG, Nadel H, Johnson M, Walton V, Kirk A, Pickett C. (2008) *Psytalia lonsburyi* (Hymenoptera: Braconidae), potential biological control agent for the olive fruit fly in California. *Biological Control* 44: 79 – 89.

Daane KM y Johnson MW. (2010) Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology* 55:151-169.

Daane K, Johnson M, Pickett C, Sime K, Wang XG, Nadel H, Andrews J, Hoelmer K. (2011) Biological controls investigated to aid management of olive fruit fly in California. *California Agriculture* 65: 21 - 28.

Dib H, Jamont M, Sauphanor B, Capowiez Y. (2016) The feasibility and efficacy of early-season releases of a generalist predator (*Forficula auricularia* L.) to control populations of the RAA (*Dysaphis plantaginea* Passerini) in Southeastern France. Bulletin of Entomological Research 106: 233-241.

Dinis AM, Pereira JA, Pimenta MC, Oliveira J, Benhadi-Marín J, Santos SAP. (2015) Suppression of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) pupae by soil arthropods in the olive grove. Journal of Applied Entomology.

Dinis AM, Pereira JA, Benhadi – Marín J, Santos SAP. (2016) Feeding preferences and functional responses of *Calathus granatensis* and *Pterostichus globosus* (Coleoptera: Carabidae) on pupae of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). Bulletin of Entomological Research. DOI: 10.1017/S0007485316000213.

Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 21 de octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. Diario Oficial de la Unión Europea 309: 71 – 83.

Dogaç E, Kandemir I, Taskin V. (2013) The genetic polymorphisms and colonization process of olive fly populations in Turkey. Plos One 8 doi:10.1371/journal.pone.0056067.

Dogaç E, Kandemir I, Taskin V. (2014). Geographical distribution and frequencies of organophosphate- resistant *ace* alleles and morphometric variations in olive fruit fly populations. Pest Management Science 71 :1529-1539

Downie DA. (2000) Patterns of genetic variation in native grape phylloxera on two sympatric host species. Molecular Ecology. 9:505-514.

Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Molecular Ecology 11 : 2571 – 2581.

Economopoulos AP, Haniotakis GE, Mathioudis J, Missis N, Kinigakis P. (1978) Long-distance flight of wild and artificially reared *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae). Journal of Applied Entomology 87: 101 – 108.

Elbert A y Nauen R. (2000) Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special referenceto neonicotinoids. Pest Management Science 56: 60 - 64.

Elfekih S, Shannon M, Haran J, Vogler AP. (2014). Detection of the Acetylcholinesterase Insecticide Resistance Mutation (G328A) in Natural Populations of *Ceratitis capitata*. Journal of Econonic Entomology. 107(5): 1965-68.

Esencia de olivo: www.esenciadeolivo.es

Eti CN, Dogaç E, Gocmen Taskin B, Gokdere G, Taskin V. (2017) Population structure and patterns of geographic differentiation of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) in eastern Mediterranean Basin. Mitochondrial DNA part A: DNA Mapping, Sequencing and Analysis. doi: 10.1080/24701394.2017.1404045.

Excoffier L, Smouse P, Quattro JM. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47 – 50.

Felsenstein J (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Feyereisen R, Dermauw W, van Leeuwen T. (2015) Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. Pesticide Biochemistry and Physiology. 121: 61 – 77.

FFrench – Constant R y Bass C. (2017) Does resistance really carry a fitness cost? Current opinion in Insect science 21: 39 - 46.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3: 294-299

Footo RH, Blanc FL, Norrborn AL. (1993) Handbook of the Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) of America North of Mexico. Comstock, Ithaca, NY.

Frey JE, Guillén L, Frey B, J Samietz, Rull J, Aluja M. (2013) Developing diagnostic SNP panels for the identification of true fruit flies (Diptera: Tephritidae) within the limits of COI-Based species delimitation. BMC Evolutionary Biology doi: 10.1186/1471-2148-13-106.

Froufe E, Grié V, Faria J, Ghamizi M, Gonçalves DV, Gürlek ME, Karaouzas I, Kebapci U, Sereflisan H, Sobral C, Sousa R, Teixeira A, Varandas S, Zogaris S, Lopes-Lima M. (2016) Phylogeny, Phylogeography and evolution in the Mediterranean region: News from a freshwater mussel (Potomida, Unionida). Molecular Phlogenetic Evolution 100: 322 – 332.

Fu YX. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. Genetics 147: 915-925

Gagnon AE, Doyon SJ, Heimpel GE, Brodeur J. (2011) Prey DNA detection success following digestion by intraguild predators: influence of prey and predator species. Mol Ecol Res, 11, 1022-1032.

Galtier N, Depaulis F, Barton NH. (2000) Detecting bottlenecks and selective sweeps from DNA sequence polymorphism. Genetics. 155: 981 – 987.

Gao J y Scott J. (2006). Role of the transcriptional repressor mdGfi-1 in CYP6D1v1 mediated insecticide resistance in the house fly *Musca domestica*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 36: 387-95.

Gasperi G, Guglielmino CR, Malcrida AR, Milani R. (1991) Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata*. Heredity. 67: 347-356.

Gkissakis V, Volakakis N, Kollaros D, Bàrberi P, Kabourakis EM. (2016) Soil arthropod community in the olive agroecosystem: Determined by environment and farming practices in different management systems and agroecological zones. Agriculture Ecosystems and Environment 218: 178-189.

Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. (2008) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*. doi.org/10.1111/j.1096-0031.2008.00217.x

Gómez del Campo M y Barranco D. (2009) Informe sobre la Situación del olivar en España y el Seguro agrario. Universidad de Córdoba y Universidad Politécnica de Madrid.

González Cabrera J, García M, Hernández Crespo P, Farinós GP, Ortego F, Castañera P. (2013) Resistance to Bt maize in *Mythimma unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) is mediated by an alteration in Cry1Ab protein activation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 635-43.

Gonçalves MF, Malheiro R, Casal S, Torres L, Pereira JA. (2012) Influence of fruit traits on oviposition preference of the olive fly *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) on three Portuguese olive varieties (Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana) *Scientia Horticulturae* 145: 127 – 135.

Gopurenko D, Hughes JM, Keenan CP. (1999) Mitochondrial DNA evidence for rapid colonisation of the Indo – West Pacific by the mud crab *Scylla serrata*. *Mar Biol* 134: 227 – 233.

Guillespie JH y Langley CH. (1974) A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics*. 76: 347-356.

Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Series*. 41, 95–98.

Harper GL, King RA, Dodd CS, Harwood JD, Glen DM, Bruford MW, Symondson WOC, (2005). Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Mol Ecol*: 14, 819–827

Harwood JD, Desneux N, Yoo HJ, Rowley DI, Greenstone MH, Obrycki JJ, O’Neil RJ. (2007) Tracking the role of alternative prey in soybean aphid predation by *Orius insidiosus*: a molecular approach. *Molecular Ecology*, 16: 4390–4400

Hawkes NJ, Janes RW, Hemingway J, Vontas J. (2005) Detection of resistance associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 81: 154-163.

Heckel D. (2012) Insecticide resistance after silent spring. *Science* 337: 1612 – 1614.

Herbert PDN, Ratnasingham S, Waard JR. (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceeding of the Royal Society B*. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025.

Hernández S. (2010) Filogeografía de una plaga agrícola: significado para su control biológico y efectos medio-ambientales (*Bactrocera oleae*). Madrid. España. Universidad Complutense de Madrid. Trabajo fin de Máster.

Hernández S, Callejas C, Matallanas B, Ochando MD. (2012) New information about genetic structure of *Bactrocera oleae* species revealed by ISSR markers. *Integrated protection of olive crops – IOBC-WPRS Bulletin*. 79: 15-23.

Hu J, Zhang JL, Nardi F, Zhang RJ. (2008) Population genetic structure of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), from China and Southeast Asia. *Genetica* 134:319–324

Huala Jimenez L, Rebolledo R, Carrillo R, Elgueta M, Paredes M. (2017) Morphometric and molecular differences among *Calvertius tuberosus* (Coleoptera: Curculionidae) populations associated with Andean and coastal populations of *Araucaria araucana* in the La Araucanía Region, Chile. *Revista Brasileira de entomologia: Systematics, Morphology and Biogeography* 62: 119 – 124.

Hsu JC, Haymer D, Wu WJ, Feng HT. (2006) Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated with resistance to organophosphorus insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 396 – 402.

International Olive Council (IOC) (2016): www.internationaloliveoil.org

Interprofesional del Aceite de Oliva de España: www.aceitesdeolivadeespana.com

Insecticide Resistance Action Committee, IRAC: www.irac-online.org

Jiménez Álvarez, A (1998). Tephritidae- *Dacus oleae*/ *Bactrocera oleae* (Gmelin) Madrid 1ª edición. 915-917 En: Entomología agroforestal. Insectos y ácaros que dañan montes, cultivos y jardines. Ediciones agrotécnicas SL.

Junta de Extremadura, Dirección General de Agricultura y Ganadería (2017). Plan estratégico para el fomento de la producción ecológica en Extremadura. Junta de Extremadura Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio.

Kaniewsky D, Van Campo E, Boiy T, Terral JF, Khadari B, Besnard G. (2012) Primary domestication and early uses of emblematic olive tree: paleobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews*. 87: 855 – 899.

Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos TJ, Seraphides NA, Skouras PJ, Tsitsipis JA, Mathiopoulos KD (2008). A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 781-787.

Kakani EG, Bon S, Massoulié J, Mathiopoulos KD. (2011) Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41: 150 – 158.

Kakani EG, Trakala M, Drosopoulou E, Mavragani- Tsipidou P, Mathiopoulos KD (2013a). Genomic structure, organization and localization of the acetylcholinesterase locus of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Bulletin of Entomological Research*. 103: 36-47.

Kakani EG, Sagri E, Omirou M, Ioannides IM, Mathiopoulos KD (2013b). Detection and geographical distribution of the organophosphate resistance associated $\Delta 3Q$ *ace* mutation in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi). *Pest Management Science*. 70: 743-750.

Kim YH, Lee SH. (2013). Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the class insecta? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 47-53.

Kimura M y Crow JF. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. 49: 725 – 738.

King RA, Read DS, Traugott M, WOC Symondson (2008). Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA based approaches. *Molecular Ecology* 17: 947-963.

King RA, Moreno-Ripoll R, Agusti N, Shayler SP, Bell JR, Bohan DA, Symondson WOC. (2010) Multiplex reactions for the molecular detection of predation on pest and non pest invertebrates in agroecosystems. *Molecular Ecology Resources* 11 :370-373.

Kumar S, Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

Labbé P, Berthomieu A, Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M. (2007) Independent duplications of the acetylcholinesterase gene conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1056 – 1067.

Lantero E, Matallanas B, Pascual S, Callejas C. (2018) PCR Species-Specific Primers for Molecular Gut Content Analysis to Determine the Contribution of Generalist Predators to the Biological Control of the Vector of *Xylella fastidiosa*. *Sustainability*. 10, pp. 1 - 8. 28/06/2018.

Lee SH, Kim YH, Kwon DH, Cha DJ, Kim JH. (2014) Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: implications for pesticide resistance and tolerance. *Pesticide Biochemistry and physiology*. 120: 118 – 124.

León JH, Fournier V, Hagler JR, Daane KM, 2006. Development of molecular diagnostic markers for sharpshooters *Homalodisca coagulate* and *Homalodisca liturata* for use in predator gut content examinations. *Entomol Exp Appl*, 119: 109–119

Lewontin RC. (1972). The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-384.

Lin H, Downie DA, Walker MA, Granett J, English-Loeb G. (1999) Genetic structure in native populations of grape phylloxera (Homoptera: Phylloxeridae). *Annals of the Entomological Society of America*. 92: 376-381.

Loukas M y Kimbras CB. (1983) History of olive cultivars based on their genetic distances. *Journal of Horticultural Sciences*. 58:121-127.

Lumaret R, Ouazzani N, Michaud H, Vivier G, Deguilloux MF, Di Giusto F. (2004) Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L) in the Mediterranean basin. *Heredity* 92: 434 – 451.

Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5: 153-165.

Lynch M y Milligan BG. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91 – 99.

MacDonald AJ, Young MJ, Lintermans M, Sarre SD (2014). Primers for detection of Macquarie perch from environmental and trace DNA samples. *Conservation Genetics Resources*, 6: 551- 553

MAPAMA Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
www.magrama.gob.es

MAPAMA (2014) Guía de Gestión Integrada de Plagas, Olivar. Ministerio de Agricultura Pesca Alimentación y Medio Ambiente. ISBN: 978-84-491-1410-6.

MAPAMA (2016) Informe de resultados de aplicación del PAN 2016. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria.

MAPAMA Subdirección General de Calidad Diferenciada y Agricultura Ecológica.

Malheiro R, Casal S, Baptista P, Pereira JA. (2015) A review of *Bactrocera oleae* (Rossi) impact in olive products: from the tree to the table. Trends in Food Science and Technology 44: 226 – 242.

Marchini D, Petacchi R, Marchi S. (2017) *Bactrocera oleae* reproductive biology: new evidence on wintering wild populations in olive groves of Tuscany (Italy). Bulletin of Insectology 70: 121 – 128.

Matallanas B, Ochando MD, Vivero A, Beroiz B, Alonso F, Callejas C. (2011) Mitochondrial DNA variability in Spanish populations of *A. italicus* inferred from the analysis of a COI region. Knowledge Management Aquatic Ecosystems. doi: 10.1051/kmae/2011052.

Matallanas B, Lantero E, M'Saad M, Callejas C, Ochando MD. (2013) Genetic polymorphism at the cytochrome oxidase I gene in mediterranean populations of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). Journal of Applied Entomology. 137: 624-630.

McCoy R J, Akey JM. (2017) Selection plays the hand it was dealt: evidence that human adaptation commonly targets standing genetic variation. Genome Biology <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1280-5>.

McPherson BA y Han HY. (1997) Phylogenetic analysis of North American *Rhagoletis* (Diptera:Tephritidae) and related genera using mitochondrial DNA sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution. 7: 1-16.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Israel, MoAg: <https://www.moag.gov.il>

Ministerio de Desarrollo Rural y Alimentación de Grecia, decisión ministerial 8197/90920/22-7-2013. (2013) GR National Action Plan on Sustainable Use of Pesticides (Plan protection products)

Montiel A, Madueño C. (1995) Determinación del umbral de tratamiento para la mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmel., Diptera: Tephritidae) en el olivar destinado a la producción de aceite. Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas, 21:577-588.

Monzó C, Sabater-Muñoz B, Urbaneja A, Castañera P. (2010) Tracking medfly predation by the wolf spider, *Pardosa cribata* Simon, in citrus orchards using PCR-based gut-content analysis. Bulletin of Entomological Research 100: 145–152

Monzó C, Sabater-Muñoz B, Urbaneja A, Castañera P. (2011) The ground beetle *Pseudophonus rufipes* revealed as predator of *Ceratitis capitata* in citrus orchards. Biological Control 56: 17-21.

Moreno-Ripoll R, Gabarra R, Symondson WOC, King RA, Agustí N. (2012) Trophic relationships between predators, whiteflies and their parasitoids in tomato greenhouses: a molecular approach. Bulletin of Entomological Research, 102: 415–423

Mun J, Bohonak AJ, Roderick GK. (2003) Population structure of the pumpkin fruit fly *Bactrocera depressa* (Tephritidae) in Korea and Japan: Pliocene allopatry or recent invasion? Molecular Ecology 12:2941–2951.

Muñoz A y García F. (2012) Eficacia del trampeo masivo en el control de la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae): determinación del daño a fruto y de la pérdida económica en cantidad y calidad del aceite. Boletín de Sanidad Vegetal y Plagas. 38: 291 – 309.

Mutero A, Pravalorio M, Bride JM, Fournier D. (1994) Resistance associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. Proceedings of National Academy of Science USA. 91: 5922 – 5926.

Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F. (2003) The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. Insect Molecular Biology 12: 605-611.

Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). Molecular Ecology 14, 2729-2738.

Nardi F, Carapelli A, Vontas JN, Dallai R, Roderick GK, Frati F. (2006) Geographical distribution and evolutionary history of organophosphate-resistant Ace alleles in the olive fly (*Bactrocera oleae*). Insect Biochemistry and Molecular Biology 36: 593-602.

Nardi F, Carapelli A, Boore JL, Roderick, G K, Dallai R, Frati F. (2010) Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: Comparative dating using complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 678-686.

Nardi F y Frati F. (2011) The olive fly *Bactrocera oleae* keeping up in an ever changing environment. *Team newsletter*.10: 3-8.

National Center for Biotechnology Information NCBI.
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Nei M. (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 106: 283 – 292.

Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583 – 590.

NETWORK. (<http://www.flexus-engineering.com>)

Neuenschwander P, Bigler F, Delucchi V, Michelakis S. (1983). Natural enemies of preimaginal stages of *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae) in Western Crete. *Bionomics and phonologies. Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria "Filippo Silvestri"*, 40, 3–32.

O'Rourke R, Lavery S, Jeffs A. (2012). PCR enrichment techniques to identify the diet of predators. *Molecular Ecology Resources* 12: 5-17

Ochando MD, Reyes A, Callejas C, Segura D, Fernández P. (2003) Molecular genetic methodologies applied to the study of fly pests. *Trends in Entomology*, 3:73-85.

Orsini M, Daane K, Sime K, Nelson E. (2007) Mortality of the olive fruit fly pupae in California. *Biocontrol Science and Technmology*. 17: 797- 807.

Ortega M y Pascual S. (2013) Spatio – temporal analysis of the relationship between landscape structure and the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: tephritidae). *Agricultural and Forest Entomology* doi: 10.1111/afe.12030.

Pascual S, Cobos G, Series E, González-Núñez M. (2010) Effects of processed kaolin on pest and non- target arthropods in a Spanish olive grove. *Journal of Pest Science*, 83 (2): 121-133.

Pascual S, Cobos G, Seris E, Sánchez-Ramos I, González-Núñez M. (2014) Spinosad bait sprays against the olive fruit fly (*Bactrocera oleae* ((Rossi)): effect on the canopy non target arthropod fauna. *International Journal of Pest Management* 60: 258 – 268.

Pentisaari M, Salmela H, Mutanen, Roslin T. (2016). Molecular evolution of a widely adopted taxonomic marker (COI) across the animal tree of life. *Scientific Reports* doi.org/10.1038/srep35275.

Pereira- Castro I, Van Asch B, Trinidad- Rei F, Teixeira Da Costa L. (2015). *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) organophosphate resistance alleles in Iberia: Recent expansion and variable frequencies. *European Journal of Entomology*. 112: 20-26.

Petacchi R, Marchi S, Federici S, Ragaglini G. (2014) Large scale simulation of temperature dependent phenology in wintering populations of *Bactrocera oleae* (Rossi). *Journal of Applied Entomology* 139: 496 – 509.

Phylogeoviz: Google Summer of Code (2007): <http://phylogeoviz.org/>

Picchi MS, Bocci G, Petacchi R, Entling MA. (2016) Effects of local and landscape factors on spiders and olive fruit flies. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 222: 198-147.

Picchi MS, Marchi S, Albertini A, Petacchi R. (2017) Organic management of olive orchards increases the predation rate of overwintering pupae of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *BioControl* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.02.002>

Pimmentel D. (1996) Green revolution agriculture and chemical hazards. *The Science of the Total Environment*. 188: S86- S88.

Pingali P. (2012) Green revolution: impacts, limits and the path ahead. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 109: 12302 - 12308.

Ponti L, Gutierrez PA, Ruti PM, Dell'Aquila A. (2014) Fine-scale ecological and economic assessment of climate change on olive in the Mediterranean Basin reveals winners and losers. Proceedings of the National Academic of Science USA doi: 10.1073/pnas.1314437111.

Porretta D, Mastrantonio V, Bellini R, Somboon P, Urbanielli S. (2012). Glacial history of a modern invader: phylogeography and species distribution modelling of the asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. Plos One doi.org/10.1371/journal.pone.0044515.

Posada D y Crendall KA. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14: 817 – 818.

PROSODOL (2015): www.prosodol.gr

Purugganan M y Gibson G. (2003) Merging ecology, molecular evolution and functional genetics. Molecular Ecology 12: 1109 – 1112.

RAIF: Red de Alerta e Información Fitosanitaria Junta de Andalucía
<https://www.juntadeandalucia.es/agriculturapescajdesarrollorural/raif/>

Rambaut A. (2010) FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.

Ramos – Onsins SE y Rozas J (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. Mol Biol Evol 19: 2092 – 2100.

Real Decreto 1201/2002 del 20 de noviembre por el que se regula la producción integrada de productos agrícolas. Boletín Oficial del Estado nº 287, BOE-A-2002-23340.

Real Decreto 1311/2012 del 14 de septiembre por el que se establece el marco de acción para conseguir un uso sostenible de productos fitosanitarios. Boletín Oficial del Estado nº 223, BOE- A-2012-11605,

Rejili M, Fernandes T, Dinis AM, Pereira JA, Baptista P, Santos SAP, Lino-Neto T. (2016). A PCR based diagnostic assay for detecting DNA of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, in the gut of soil-living arthropods. Bulletin of Entomological Research, 106: 695-699.

Rice RE. (2000) Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae*. UC Plant Protection Quarterly 10, 1-5.

Roderick GK. (1996) Geographic structure of insect populations; gene flow, phylogeography and their uses. Annual Reviews in Entomology. 41:325 – 352.

Rodriguez MA, Bosch D, Sauphanor B, Avilla J. (2010) Susceptibility to organophosphate insecticides and activity detoxifying enzymes in Spanish populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Journal of Economic Entomology 103: 482 – 491.

Rogers AR y Harpending H. (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. Molecular biology and evolution. 9: 552 – 569.

Rohlf FJ. (2000) NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.10q, Exeter Publishing, Ltd., Setauket, NY

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres D, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2011) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst Biol 61: 539 – 542.

Rosenheim JA, Limburg DD, Colfer RG. (1999). Impact of generalist predators on a biological control agent, *Chrysoperla carnea*: direct observations. Ecol Appl, 9: 409–417.

Rowley C, Cherrill A, Leather SR, McCormack AW, Skarp JE, Pope TW. (2017) PCR – based gut content analysis to identify arthropod predators of *Haplodiplosis marginata*. Biological Control 115: 112 – 118.

Rozas J, Sánchez-Del Barrio JC, Messenguer X, Rozas R. (2008) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19: 2496-2497.

Rubio de Casas R, Besnard G, Schonswetter P, Balaguer L, Vargas P. (2006) Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea* L. Theoretical Applied Genetics doi: 10.1007/s0012200603062.

Ruiz Castro A. (1948) Fauna entomológica del olivo en España (I). Estudio sistemático – Biológico de las especies de mayor importancia económica. Instituto Español de Entomología. CSIC Madrid.

Sagri E, Reczko M, Gregoriou ME, Tsoumani K, Zygouridis NE, Salpea KD, Zalom FG, Ragoussis J, Mathiopoulos KD. (2014) Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in spinosad resistance. BMC Genomics doi: 10.1186/1471-2164-15-714

Salvi D, Harris DJ, Kaliontzopoulou A, Carretero MA, Pinho C. (2013) Persistence across Pleistocene ice ages in Mediterranean and extra- Mediterranean refugia: phylogeographic insights from the common wall lizard. BMC Evolutionary Biology 13:147.

Sarasate M. (1990) Structural features of cytochrome oxidase. Quarterly Reviews of Biophys 23:331-336.

Schneider S y Excoffier L. (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. Genetics 152: 1079 – 1089.

Scheet P y Stephens M. (2006). A Fast and Flexible Statistical Model for Large-Scale Population Genotype Data: Applications to Inferring Missing Genotypes and Haplotypic Phase. American Journal of Human Genetics. 78: 629-644.

Segura MD. (2002) Análisis poblacional y evolutivo en *Bactrocera oleae* (Gmelin) mediante el uso de marcadores moleculares. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. Tesis Doctoral.

Segura MD, Callejas C, Fernández MP, Ochando MD. (2006) New contributions towards the understanding of the phylogenetic relationships among economically important fruit flies (Diptera: Tephritidae). Bulletin of Entomological Research 96: 279 – 288.

Segura MD, Callejas C, Ochando MD. (2008) *Bactrocera oleae*: a single large population in Northern Mediterranean basin. Journal of Applied Entomology 132: 706-713.

Sheikh A, Ahmed M, Mutwakil M, Saini K, Alsulaimany F, Hanafy A, Sabir J. (2018) Comparative molecular analysis of ISSR markers in Arabian horse breeds. *Journal of Animal and Plant Sciences* 28: 332 – 336.

Shi W, Kerdelhue C, Ye H. (2005) Population genetics of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Yunnan (China) based on mitochondrial DNA sequences. *Environmental Entomology* 34: 977 – 983.

Shi W, Kerdelhue C, Ye H. (2010) Population genetic structure of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) from Yunnan province (China) and nearby sites across the border. *Genetica* 138:377–385.

Shlötterer C. (2004) The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63 – 69.

Singh S, Mishra VK, Kumar Bhoi T. (2017) Insect molecular markers and its utility. A review. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* 10: 469 – 479.

Sint D, Raso L, Kaufmann R, Traugott M. (2011) Optimizing methods for PCR based analysis of predation. *Molecular Ecology Resources* 11: 795 – 801.

Skouras PJ, Margaritopoulos J, Seraphides N, Ioannides I, Kakani E, Mathiopoulos K, Tsitsipis J. (2007) Organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* populations in Greece and Cyprus. *Journal of Pest Science*. 63: 42 – 48.

Slatkin M y Hudson RR. (1991) Pairwise comparasion of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555-562.

Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457 – 432.

Spanos L, Koutroumbas G, Kotsyfakis M, Louis C. (2000) The mitochondrial genome of the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Insect Molecular Biology* 9: 139–144.

Sparks T, Crouse G, Durst G. (2001) Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Management Science*. 57: 896 – 905.

Sparks TC y Nauen R. (2014) IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 121: 122-128.

Stephens M, Smith N, Donnelly P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*. 68: 978-989.

Stephens M y Donnelly P. (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics*, 73, 1162-1169

Sulimova GE, Voronkova VN, Perchun AV, Gorlov IF, Randelin AV, Slozhenkina MI, Zlobina E. (2016) Characterization of the Russian beef cattle breed gene pools using inter simple sequence repeat DNA analysis (ISSR analysis). *Russian Journal of Genetics* 52: 963 – 968.

Symondson WOC, Glen DM, Erickson ML, Liddell JE, Langdon CJ. (2000) Do earthworms help to sustain the slug predator *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) within crops? Investigations using monoclonal antibodies. *Molecular Ecology*. doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01006.x

Symondson WOC. (2002) Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*, 11: 627–641.

Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585 – 595.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011) MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731 – 2739.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. (1997) The Clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24: 4876- 4882.

Torres-Vila LM, Rodríguez-Molina MC, Martínez JA. (2003) Efectos del daño de la mosca del olivo y del atroje sobre la microflora en pasta y la acidez del aceite virgen de oliva. *Grasas y Aceites*. 58 (3): 285-294.

Torres MJ y Montiel A. (2007) Eficacia de los tratamientos mediante árboles cebo contra la mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmel: Tephritidae, Diptera) en la provincia de Jaén. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*. 33: 249 – 266.

Van Asch B, Pereira – Castro I, Rei F, Teixeira da Costa L. (2013) Mitochondrial haplotypes revealed olive fly (*Bactrocera oleae*) population substructure in the Mediterranean. *Genetics* 140: 181 – 187.

Van Asch B, Pereira – Castro I, Rei F, Teixeira da Costa L. (2015) Marked genetic differentiation between western Iberian and Italic populations of olive fly: southern France as intermediate area. *Plos One* doi: 10.1371/journal0pone.0126702

Vázquez - Gil D. (2011) De especie silvestre (Kótinós) a olivo sagrado (élaíos). Notas sobre el cultivo del olivar, la producción, la comercialización y el consumo de aceite de oliva en el Mediterráneo antiguo. *Boletín de la Real Academia de Extremadura de las Letras y las Artes*. 591 – 672.

Vontas JG, Cosmidis N, Loukas M, Tsakas S, Hejazi MJ, Ayoutani A, Hemingway J. (2001) Altered Acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 71: 124-132.

Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, Hemingway J. (2002) Resistance associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology*. 11: 329-336.

Vontas JG, Hernández – Crespo P, Margaritopoulos JT, Ortego F, Feng HT, Mathiopoulou KD, Hsu JC. (2011) Insecticide resistance in tephritid flies. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100_ 199 – 205.

Wan X, Nardi F, Zhang B, Liu Y. (2011) The oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* in China: origin and gradual inland range expansion associated with population growth. *Plos One*. doi: 10.1371/journal.pone.0025238.

Wang XG, Johnson M, Daane K, Yokoyama V. (2009) Larger olive fruit size reduces the efficiency of *Psytalia concolor* as a parasitoid of the olive fruit fly. *Biological Control* 49: 45 – 51.

Wang XG, Johnson M, Yokoyama V, Pickett C, Daane K. (2010) Comparative evaluation of two olive fruit fly parasitoids under varying abiotic conditions. *Biological Control* 56: 283 – 293.

Wang XG, Levy K, Son Y, Johnson M, Daane K. (2011) Comparison on the thermal performance between a population of the olive fruit fly and its co adapted parasitoids. *Biological Control*. 60: 247 – 254.

Wang LS y Xu Y. (2003) Haplotype inference by maximum parsimony. *Bioinformatics*, 19: 1773–1780.

Wanwisa J, Visut B, Pattamaporn K. (2003) Molecular evolution of tephritid fruit flies in the genus *Bactrocera* based on the cytochrome oxidase I gene. *Genetica* 119: 19–25.

White IM. (2000) Morphological features of the tribe Dacini (Dacinae): their significance to behaviour and classification. En *Fruit flies (Tephritidae): Phylogeny and evolution of behaviour*. 505 – 533.

Yang J, Tian L, Xu B, Xie W, Wang S, Zhang Y, Wang X, Wu Q. (2015) Insight into the migration routes of *Plutella xylostella* in China using mtCOI and ISSR Markers. *PlosOne* doi.org/10.1371/journal.pone.0130905

Yeh FC, Yang RC, Boyle T. (1999) POPGENE: Microsoft Windows based freeware for population genetic analysis. Release 1.31 University of Alberta, Edmonton.

Zaidi R, Jaal Z, Hawkes N, Hemingway J, Symondson WOC. (1999) Can multicopy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators? *Molecular Ecology* 8: 2081 – 2087.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) Anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176 – 183.

Zohary D y Hopf M. (1994) *Domestication of Plants in the Old World* (2ª edición), Claredon, Oxford, 279.

Zygouridis NE, Augustinos AA, Zalom FG, Mathiopoulos KD. (2009) Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity* 102, 402-412